

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Si vous êtes en cotutelle internationale, remplissez ce champ en notant : Cotutelle internationale avec "nom de l'établissement", sinon effacer ce texte pour qu'il n'apparaisse pas à l'impression

---

**Présentée et soutenue par :**

**Salifou Kader**

**le** mardi 28 avril 2015

**Titre :**

Les histones déméthylases JMJD2A et JARID1A/B dans la régulation transcriptionnelle de la prolifération cellulaire

---

**École doctorale et discipline ou spécialité :**

ED BSB : Génétique moléculaire

**Unité de recherche :**

LBCMCP UMR5088

**Directeur/trice(s) de Thèse :**

Dr. Marie Vandromme

**Jury :**

Précisez les nom, prénom et qualité des membres du jury

Pr. Kerstin Bystricky, Présidente

Pr. Philippe Bouvet, Rapporteur

Dr. Eric Julien, Rapporteur

Dr. Philippe Arnaud, Rapporteur

Dr. Marie Vandromme, Directrice de thèse



## **Abstract :**

In eukaryote nuclei, DNA is wrapped around histone proteins. This structure is called the chromatin. The compaction level of chromatin is highly dynamic. This allows the regulation of gene transcription which requires free access to the DNA. Histone proteins undergo several post translational modifications including methylation that impact chromatin compaction. For example, at genes promoters, methylation on the lysine 9 of histone H3 (H3K9) is associated with chromatin compaction and thereby transcription repression, whereas methylation on histone H3 lysine 4 (H3K4) is associated with transcriptional activation. Histone methylation is set by enzymes called histone methyltransferases and removed by histone demethylases which are specific for methylated residues. During my PhD, I studied the role of histone demethylases in the transcriptional regulation of cell proliferation master genes, E2F-regulated genes and rDNA transcription.

E2F transcription factors regulate genes like *CCNE* or *CDC6* involved in entry and progression through S phase. Those genes must be activated at the onset of S phase. The transcriptional control of those genes is crucial for a normal cell cycle, and their deregulation is associated with cancer development. Histone methylation events are involved in the repression and activation of E2F target genes during cell cycle progression. However the histone demethylases involved are still unclear. We have shown that the H3K4-specific histone demethylases JARID1A and JARID1B are involved in the fine-tuning of *CCNE* and *CDC6* transcription during S phase. JARID1A and JARID1B are recruited on the promoter of those genes and help limiting their activation at the beginning of S phase. This study shows for the first time the role of those histone demethylases in the fine tuned regulation of E2F targets genes during S phase.

Ribosomal DNA (rDNA) transcription is the first step of ribosome biogenesis. rDNA is transcribed in the nucleolus by RNA polymerase I (Pol-I). Pol-I transcription is tightly linked to cell growth and proliferation. High levels of Pol-I transcription along with hypertrophied nucleoli is a hallmark of several cancers cells. Pol-I transcription must be regulated according to the availability of growth factors. It is repressed when the cells are deprived of growth factors and activated when growth factors are available. This regulation is under the control of cellular signaling pathways including the Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K) pathway. Histone methylation events are known to play a role in this regulation. However little is known about how the cell signaling pathways modulate the chromatin

response in this process. In collaboration with the team of Dr. Konstantin Panov, we observed that the H3K9-specific histone demethylase JMJD2A is present in the nucleoli of human cells. We showed that JMJD2A, through its ability to demethylate H3K9, is required for the activation of Pol-I transcription in response to growth factors. We further show that PI3K regulate this chromatin response by triggering accumulation of JMJD2A in the nucleoli in response to growth factors. This study demonstrates a yet unknown role for JMJD2A in Pol-I transcription and suggests that the control of JMJD2A localization by the PI3K pathway is a crucial mechanism by which cells adapt protein synthesis to the availability of growth factors.

My PhD work helps strengthening our understanding of the mechanisms that involve histone demethylases in the regulation of cell proliferation genes. Understanding those mechanisms is crucial as it might help targeting those enzymes for the treatment of cell proliferation-associated diseases like cancer.

## **Résumé de la thèse :**

L'ADN des cellules eucaryotes est enroulé autour de protéines appelées histones pour former la chromatine. Le niveau de compaction de la chromatine est dynamique. Ceci permet de réguler *via* l'accessibilité de l'ADN, les processus comme la transcription. Les histones peuvent subir des modifications post traductionnelles comme la méthylation, qui influencent le niveau de compaction de la chromatine. Par exemple, au niveau des promoteurs des gènes, la méthylation sur la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9) est associée à la répression transcriptionnelle, tandis que la méthylation sur la lysine 4 (H3K4) est associée à l'activation transcriptionnelle. Ces marques sont mises en place par des histones méthyltransférases et enlevées par des histones déméthylases qui sont spécifiques des résidus méthylés. Ma thèse a porté sur l'étude d'histone déméthylases dans la régulation transcriptionnelle de gènes clé de la prolifération cellulaire, les gènes cibles de E2F et l'ADN ribosomique.

Les facteurs E2Fs régulent des gènes comme *CCNE* et *CDC6* impliqués dans l'entrée et la progression en phase S. Ces gènes sont activés au début de la phase S. Le contrôle de la transcription de ces gènes est crucial pour un cycle cellulaire normal et leur dérégulation est associée à l'apparition de cancers. La répression et l'activation des gènes cibles de E2F au cours du cycle cellulaire fait intervenir le contrôle de la méthylation des résidus H3K4 et H3K9. Cependant, les histone déméthylases impliquées sont mal connues. Nous avons montré que les histones déméthylases JARID1A et JARID1B, spécifiques de H3K4, régulent la transcription de *CCNE* et *CDC6* en phase S. JARID1A et JARID1B sont recrutées au promoteur de ces gènes. Elles sont importantes pour limiter leur activation lors de la progression en phase S. Cette étude montre pour la première fois l'implication de ces histones déméthylases dans la régulation fine des gènes cibles de E2F au cours du cycle cellulaire.

La transcription des gènes ribosomiques ou ADNr par l'ARN Polymérase I (Pol-I) est la première étape de la biogénèse des ribosomes. Elle a lieu dans les nucléoles. Ce processus est étroitement lié à la croissance et la prolifération cellulaire. Une transcription Pol-I accrue et des nucléoles hypertrophiés sont des caractéristiques communes à un grand nombre de cellules cancéreuses. La transcription Pol-I est adaptée à la disponibilité en facteurs de croissance. Ainsi, elle est réprimée lorsque les cellules sont privées en facteurs de croissance et activée en leur présence. Cette réponse est sous le contrôle de cascades de signalisation cellulaire comme la voie Phosphatidyl-Inositol-3-Phosphate (PI3K). Il est connu que des événements dynamiques de méthylation d'histones participent à cette régulation. Cependant,

on sait peu de choses sur comment les voies de signalisation régulent ces événements. En collaboration avec l'équipe du Dr. Konstantin Panov, nous avons observé que l'histone déméthylase JMJD2A, spécifique de H3K9, est présente dans les nucléoles de cellules humaines. JMJD2A, via sa capacité à démétyler H3K9, est requise pour activer la transcription Pol-I en réponse aux facteurs de croissance. Nous montrons également que PI3K régule cette réponse chromatinienne en déclenchant l'accumulation de JMJD2A dans les nucléoles en réponse aux facteurs de croissance. Cette étude indique que la régulation de la localisation subnucléaire de JMJD2A en réponse à la voie PI3K est un des mécanismes par lesquels les cellules adaptent leur capacité de synthèse protéique à la disponibilité de facteurs de croissance.

Mes travaux de thèse renforcent notre compréhension des mécanismes impliquant des histones déméthylases dans la régulation de la prolifération cellulaire. Comprendre ces mécanismes est crucial et permettra de cibler ces enzymes dans le traitement des pathologies de la prolifération cellulaire comme le cancer.

## Remerciements :

*Marie, j'ai enfin l'opportunité de te signifier ma gratitude pour m'avoir formé et soutenu pendant les quatre années qui s'achèvent. Tu as toujours été là pour moi, même lorsque tu croulais sous les obligations, lorsque les choses n'étaient pas faciles, lorsque je n'étais pas facile. Je t'en suis sincèrement reconnaissant et j'espère que comme moi tu garderas un très bon souvenir de cette période passée ensemble, avec ses hauts et ses bas.*

*Merci à toi aussi Didier, pour ton implication dans l'encadrement de cette thèse, pour tes conseils avisés et ton pragmatisme. Je pense aussi à tous les membres permanents de l'équipe, Fabrice, Cathy, Estelle, Yvan, et Virginie qui avez toujours répondu présent quand j'avais besoin de vous, et je sais que c'est arrivé souvent. Merci à tous mes pairs Sandra, Marion, Aude, Gémaël, Lucie, Maharshi et Camille pour tous les bons moments.*

*Merci à tous les membres du LBCMCP toutes équipes confondues pour la bonne ambiance. Julie, Amélie, Jonatan, François, Manu, Béra, Carole, Arnaud et tous les autres.*

*Je voudrais aussi remercier très sincèrement Slimane Ait-Si-Ali et Alain Vincent pour avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse. Vos précieux conseils aussi bien scientifiques que personnels ont vraiment fait une différence. J'en profite pour saluer l'équipe de l'école doctorale et la qualité de ses modules de formation.*

*Merci à toi Camille, tu as été à mes côtés pendant cette fin de thèse qui est de loin la période la plus éprouvante. Merci sincèrement pour ton soutien, ta présence à mes côtés dans les moments difficiles et ta contribution à la réalisation de cette thèse. J'espère que je pourrai te rendre la pareille.*

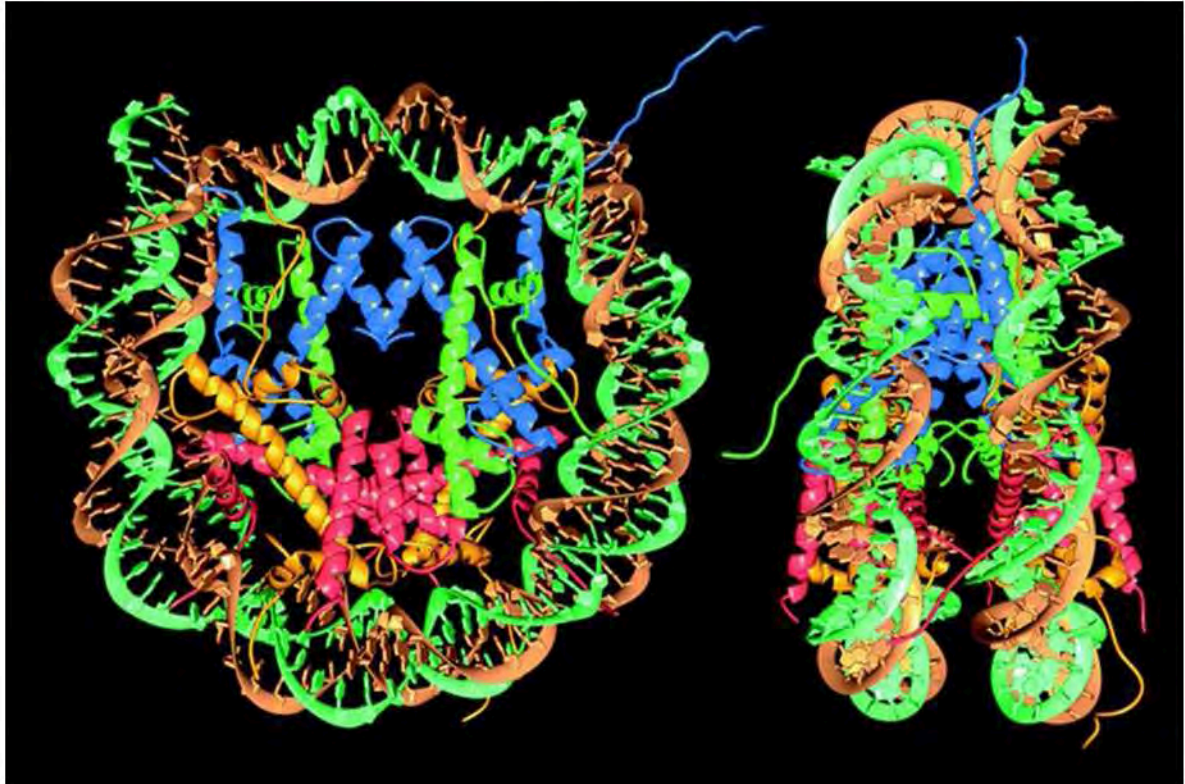
*Je veux finir en remerciant ma famille, mes grands frères Dahlil, Abdallah et surtout toi Habib (et ta moitié Mylène). Je pense à mes adorables neveux et nièces, Hayath, Cem, Yassine et toi bébé-Emile qui sait me remonter le moral avec tes sourires. Merci enfin à vous deux, Papa et Maman vous me soutenez et croyez en moi depuis le début et vous n'avez jamais ménagé le moindre effort pour m'appuyer dans tout ce que je fais.*

## Sommaire

INTRODUCTION .....	10
A. La chromatine : Généralités .....	10
I. Dynamique de la chromatine .....	10
1. Structure de la chromatine.....	10
2. Niveaux de compaction de la chromatine.....	10
II. Activités modulant la chromatine .....	12
1. Le remodelage ATP dépendant .....	12
2. L'échange de variants d'histones .....	14
3. La méthylation de l'ADN.....	18
4. Les Modifications post-traductionnelles des histones.....	20
a) L'acétylation .....	20
b) L'Ubiquitinylation .....	22
c) La Phosphorylation.....	24
d) La méthylation des histones.....	25
e) L'hypothèse du code des histones .....	28
B. La méthylation des histones sur les lysines.....	30
I. Mise en place et enlèvement .....	30
1. Les histone méthyltransférases.....	30
2. Les histone déméthylases .....	30
3. Spécificité de substrat des KMT et des KDM, apports de la cristallographie .....	33
a) Les KMT .....	33
b) Les KDM.....	37
II. Rôles de la méthylation des histones sur lysines .....	38
1. La mise en silence de l'hétérochromatine .....	38
2. L'épissage .....	39
3. La réplication : .....	39
4. La Méthylation des lysines dans la régulation de la transcription .....	42
a) Les marques de méthylation et la régulation de la transcription .....	42
b) Les familles JMJD2/KDM4 et JARID1/KDM5 dans la régulation transcriptionnelle .....	51
III. La méthylation au delà des histones .....	63
C. Chromatine, méthylation sur lysines et régulation du programme épigénétique de la prolifération cellulaires : Les gènes ribosomiques et les gènes cibles de E2F .....	65
I. Chromatine et transcription des ADN.....	65



1. La machinerie de transcription Pol-I .....	67
2. Chromatine et régulation de la transcription des ADNr.....	68
a) Organisation des ADNr .....	68
b) Les ADNr en silence .....	70
c) Les ADNr euchromatiniens actifs : .....	71
d) Les ADNr euchromatiniens réprimés : .....	71
e) Les ADNr en pause.....	73
3. Activation de la Transcription Pol-I en réponse aux facteurs de croissance et aux nutriments : les voies MAP Kinase, mTOR et PI3K .....	75
a) La voie ERK/MAP Kinase :.....	75
b) La voie mTOR :.....	75
c) La voie PI3K-AKT : .....	77
II. Chromatine et transcription des gènes cibles de E2F .....	78
1. Les facteurs de transcription E2Fs :.....	78
2. <i>Chromatine et Régulation transcriptionnelle des gènes cibles de E2F</i> :.....	80
a) -La sortie irréversible du cycle cellulaire : la différenciation et la sénescence :.....	81
b) -La répression en G0 et G1 : .....	82
c) -Activation à la transition G1/S .....	83
d) -La répression en fin de phase S : .....	84
Objectifs de la thèse:.....	86
Résultats .....	89
A. Axe1 : JMJD2A et la Régulation transcriptionnelle des gènes ribosomiques en réponse aux facteurs de croissance et aux nutriments .....	89
I. Résultats expérimentaux :.....	89
II. Conclusions :.....	101
A. Axe2 : Les histones déméthylases JARID1A/KDM5A et JARID1B/KDM5B dans la régulation transcriptionnelle des gènes cibles de E2F .....	104
I. Résultats expérimentaux :.....	104
Procédures Expérimentales.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
Discussion : .....	112
Conclusion Générale : .....	129
Références bibliographiques .....	139
Annexes .....	157



**Figure1 : Structure du nucléosome**

Structure du nucléosome (2.8Å). La double hélice d'ADN est représentée en marron et vert. les histones H3, H4, H2A et H2B en bleu, vert, jaune et rouge respectivement

*Luger et al. 1997*

# INTRODUCTION

## A. La chromatine : Généralités

### I. Dynamique de la chromatine

L'ADN, support moléculaire de l'information génétique sert de matrice pour de nombreux processus comme la transcription ou la réplication du génome qui jouent un rôle clé dans la vie de la cellule. L'ADN est intégré au sein d'une structure nucléoprotéique appelée la chromatine (Felsenfeld & Groudine, 2003). En plus de permettre la compaction du génome dans le noyau, la chromatine régule *via* l'accessibilité à l'ADN tous les processus utilisant celui-ci comme matrice. En effet, le niveau de compaction de la chromatine est dynamique et régulé par différents mécanismes qui par ce biais contrôlent les processus nécessitant l'accès à l'ADN.

#### 1. Structure de la chromatine

L'unité de base de la chromatine est le nucléosome. Un nucléosome est constitué d'environ 146 paires de bases d'ADN enroulées autour d'un octamère d'histones (**Figure1**). Les histones sont de petites protéines de 11 à 14 kDa riches en résidus basiques et donc chargées positivement dans le noyau. Les octamères sont constitués des histones dites de cœur du nucléosomes, H2A, H2B, H3 et H4. La structure du nucléosome à haute résolution a été établie : deux dimères H3-H4 sont agencés en tétramère stable au cœur avec de chaque côté un dimère H2A-H2B (Felsenfeld & Groudine, 2003; Luger *et al*, 1997). Les histones canoniques sont caractérisées par des queues N et C terminales non structurées qui émergent du nucléosome et un domaine central globulaire constitué de trois hélices alpha. Les histones interagissent entre elles *via* leur domaine globulaire. Le nucléosome est stabilisé par la présence d'une histone H1 de 21kDa dite de liaison, qui est positionnée au point d'entrée-sortie de l'ADN enroulé autour des histones de cœur (Grigoryev & Woodcock, 2012).

#### 2. Niveaux de compaction de la chromatine

Les nucléosomes s'enchaînent en une structure dite en « collier de perle » pour former la fibre de 11nm, les fibres de 11nm s'enroulent sur elles-mêmes pour former les fibres de 30nm (Grigoryev & Woodcock, 2012) (**Figure 2**). Les niveaux de compaction permettent de définir l'euchromatine et l'hétérochromatine, visibles en microscopie électronique. L'euchromatine est relâchée et riche en gènes tandis que l'hétérochromatine est beaucoup

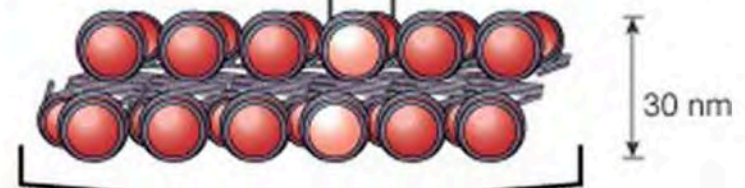
**Double hélice d'ADN**



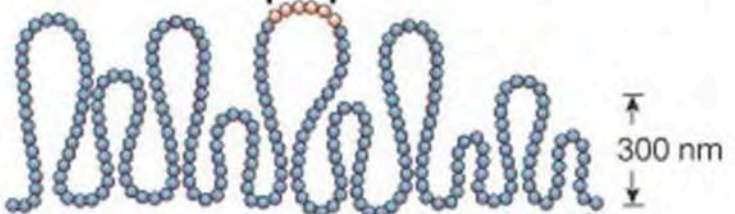
**Structure en « collier de Perles »**



**Fibre de 30 nm**



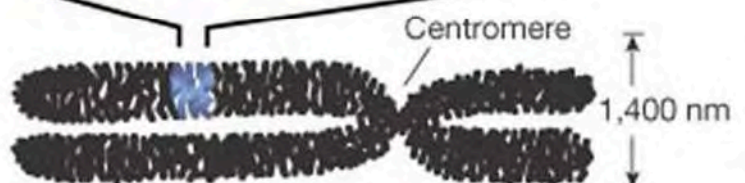
**Niveau de compaction Supérieur 1**



**Niveau de compaction Supérieur 2**



**Chromosome mitotique**



**Figure 2: Représentation des niveaux supérieurs de compaction de la chromatine**  
*Felsenfeld et al., 2003*

plus compactée, pauvre en gènes et riche en séquence répétées. Il existe deux types d'hétérochromatine.

L'hétérochromatine constitutive retrouvée au niveau des centromères et des télomères intervient dans le maintien de l'intégrité du génome et reste condensée tout au long de la vie de la cellule. Quant à l'hétérochromatine facultative, elle est condensée mais peut être décondensée dans certains contextes. Elle contient cependant des régions réprimées de façon stable comme le chromosome X inactif chez la femelle. Les frontières entre l'euchromatine et l'hétérochromatine sont démarquées par des facteurs appelés éléments insulateurs (Ong & Corces, 2009).

## II. Activités modulant la chromatine

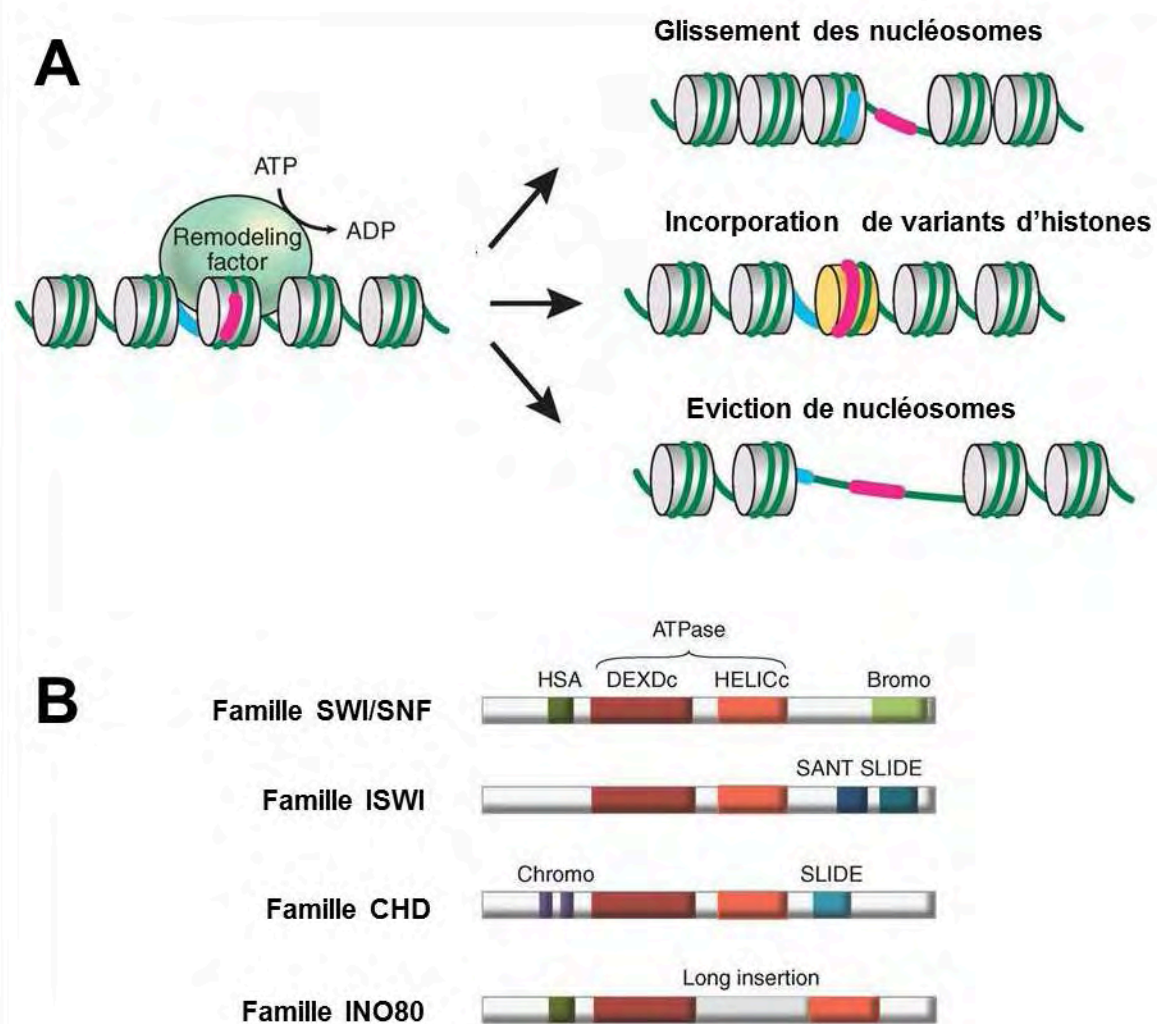
Pour contrôler l'accès à l'ADN, la structure de la chromatine est régulée de façon dynamique. Cette régulation est sous le contrôle de quatre mécanismes principaux interconnectés à savoir (1) le remodelage de la chromatine ATP-dépendant qui utilise l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour moduler le niveau de compaction, la composition des nucléosomes et l'organisation de la chromatine. (2) L'incorporation de variants d'histones dont la structure diffère de celle des histones canoniques et qui vont moduler les propriétés du nucléosome concerné (3) La méthylation de l'ADN qui va réguler la compaction de la chromatine et (4) Les modifications post-traductionnelles des histones qui vont soit moduler l'interaction entre l'ADN et les histones, soit coopérer avec les autres mécanismes sus-cités pour réguler la structure chromatinienne.

Ces différents mécanismes seront présentés et l'accent sera mis sur les modifications post-traductionnelles des histones et tout particulièrement la méthylation qui a fait l'objet de ma thèse.

### 1. Le remodelage ATP dépendant

Les complexes de remodelage de la chromatine sont capables comme leur nom l'indique de moduler la structure de la chromatine, son niveau de compaction et même sa composition. Ce sont des complexes multiprotéiques organisés autour d'une ATPase. L'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP va permettre à ces complexes de déplacer





### Figure 3 : Conséquences du remodelage de la chromatine ATP dépendant

**A-** Les modes d'action des complexes de remodelage (remodeling factor) sont illustrés en montrant les changements qu'ils entraînent dans la position ou la composition des nucléosomes. Le panel de gauche montre une région chromatiniennne de départ avec deux séquences d'ADN de référence, une en bleu située sur l'ADN entre deux nucléosomes et une en rose située sur l'ADN enroulé dans un nucléosome. Le panel de droite montre les possibles actions du complexe de remodelage.

**B-** structure des quatre ATPases qui caractérisent les quatre familles de complexe de remodelage de la chromatine. Le domaine ATPase constitué des motifs DEXDc est conservé entre les quatre familles. Les ATPases de la famille SWI/SNF possèdent un Bromodomaine et un domaine à activité hélicase HSA (helicase-SANT). Le chromodomaine des ATPase de la famille CHD est similaire à celui de la protéin HP1 (Heterochromatin Protein 1) qui lie H3K9me3.

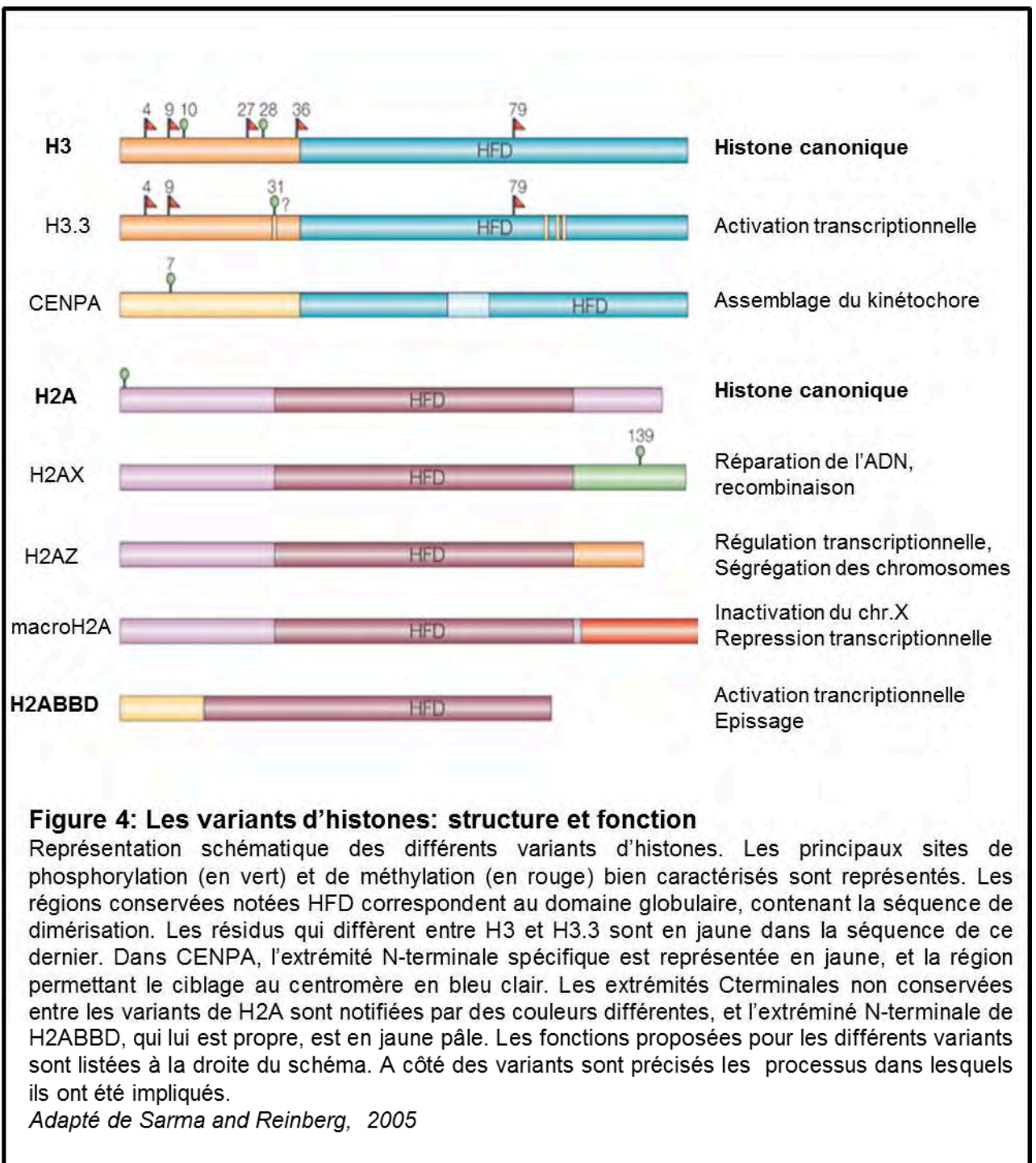
*Adapté de Becker et Workman 2013*

physiquement des nucléosomes, d'enlever ou d'intégrer des histones ou des variants d'histones, ou de faire glisser les nucléosomes le long de la molécule d'ADN (**figure 3**).

(Tang *et al*, 2010). Ainsi les complexes de remodelage participent aussi bien à la compaction qu'à la décompaction de la chromatine. Il existe plusieurs complexes de remodelage de la chromatine qui sur la base de la séquence et de la structure de la sous-unité ATPase peuvent être classés en 4 familles à savoir les familles SWI/SNF, ISWI, CHD et INO80 (Clapier & Cairns, 2009). En plus de leur capacité à incorporer des variants d'histones, les complexes de remodelage de la chromatine coopèrent avec les modifications post-traductionnelles des histones et la méthylation de l'ADN, qui seront développées dans les rubriques suivantes. Ainsi, on les retrouve associés avec des enzymes de modification des histones mais également des protéines impliquées dans la régulation par la méthylation de l'ADN. Par exemple, le complexe de remodelage de la chromatine NuRD (Nucleosome Remodeling and Deacetylation) impliqué dans la répression de la transcription contient l'ATPase CHD4 mais aussi les histones déacétylases HDAC1 et HDAC2 et la protéine MBD2 (Methyl Binding Domain 2) qui se lie à l'ADN méthylé. Le mode d'action du complexe NuRD dans la répression transcriptionnelle montre l'interconnexion entre modifications des histones, méthylation de l'ADN et remodelage ATP-dépendant dans la régulation des processus chromatinien (Kelly & Cowley, 2013). Les complexes de remodelage de la chromatine et leur mode d'action dans la régulation des processus chromatinien ont fait l'objet de plusieurs revues récentes (Becker & Workman, 2013; Tang *et al*, 2010).

## 2. L'échange de variants d'histones

Les histones canoniques H2A, H2B, H3, H4 sont exprimées et incorporées dans la chromatine exclusivement au cours de la réplication. Cependant il existe des variants d'histones qui peuvent être exprimés et incorporés aussi bien pendant la réplication qu'en dehors. Les variants d'histones sont exprimés à partir de gènes dits orphelins qui ne sont donc pas soumis à la même régulation que les gènes des histones canoniques. Des variants ont été identifiés pour toutes les histones à l'exception de H4 et les plus étudiés sont présentés dans la (**figure 4**). La différence entre les histones canoniques et leurs variants peut aller de quelques résidus (entre H3 et H3.3 par exemple) à des domaines entiers (MacroH2A qui possède un domaine macro d'environ deux fois la taille de H2A) (Bitterge & Schneider, 2014).



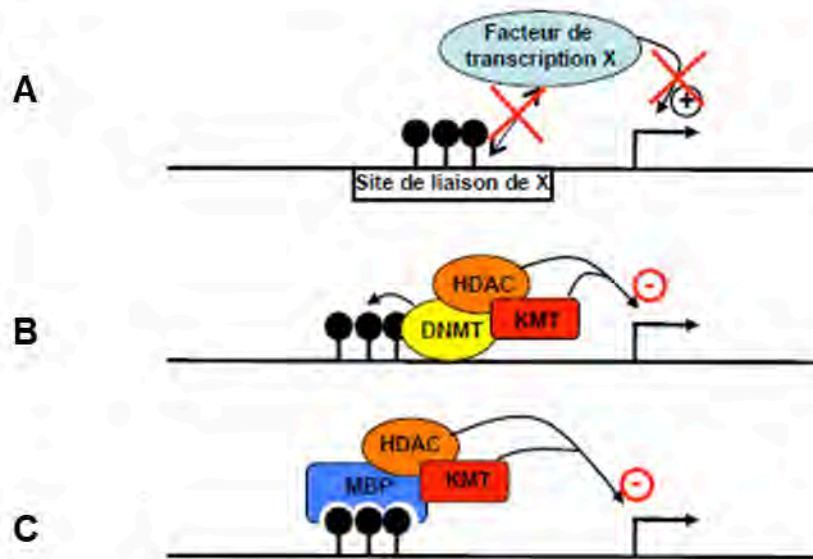


Les variants d'histones sont impliqués dans la régulation des processus chromatinien. Les variants peuvent agir directement, en modulant la stabilité du nucléosome. Il a été montré par exemple que l'incorporation du variant H2A.Z de H2A se traduit par un nucléosome plus lâche du fait d'une moins forte interaction entre les dimères (H2A.Z-H2B) et les tétramères (H3-H4) au sein du nucléosome (Suto *et al*, 2000).

L'incorporation d'un variant d'histone peut affecter indirectement le niveau de compaction de la chromatine en modulant le recrutement d'activités effectrices qui vont remodeler la chromatine (Biterge & Schneider, 2014). C'est le cas par exemple du variant d'histone macroH2A qui a été impliqué dans la répression de la transcription (Cong *et al*, 2014). L'incorporation de macroH2A empêche le recrutement de facteurs de transcription et de complexes de remodelage de la chromatine (Angelov *et al*, 2003).

Comme les histones canoniques (Voir rubrique modifications post-traductionnelles des histones), Les variants d'histones peuvent également subir des modifications post-traductionnelles qui vont réguler des mécanismes chromatinien clés. Par exemple, le variant d'histone H2A.X est incorporé de façon aléatoire dans le génome et sa phosphorylation est impliquée dans la signalisation et la réparation des dommages à l'ADN. Il a été montré que l'activité du variant de H3 CENPA est régulée par des modifications post-traductionnelles de sa queue N-terminale (Goutte-Gattat *et al*, 2013). On retrouve CENPA (Centromere Protein A), au niveau des centromères et elle est requise pour l'assemblage des kinétochores au cours de la mitose (Black & Bassett, 2008).

Les variants d'histones et leur implication dans les processus chromatinien sont présentés de façon plus exhaustive dans les revues de Biterge *et al*. (Biterge & Schneider, 2014) et Sarma *et al*. (Sarma & Reinberg, 2005).



**Figure 5: Représentation des Effets de l'ADN méthylé sur les processus chromatinien**

**A** L'ADN méthylé peut empêcher le recrutement de facteurs de transcriptions à leur séquence cible

**B** L'ADN méthyltransférase peut recruter directement des protéines de modification de la chromatine comme des histones déacétylases (HDAC) ou des histones déméthylases (KMT) qui conduiront *in fine* à la compaction de la région concernée

**C** Des protéines de liaison à l'ADN méthylé ( MBP pour Methylbinding Protein) peuvent recruter des effecteurs comme des KMT, des HDAC ou des complexes de remodelage de la chromatine qui conduiront à la compaction de la région concernée

### 3. La méthylation de l'ADN

Les séquences d'ADN peuvent être méthylées sur les cytosines, principalement au niveau de dinucléotides CG (appelés CpG) chez les mammifères. Le groupement méthyle est attaché de façon covalente sur le carbone 5 de la cytosine. La méthylation de l'ADN est mise en place par des ADN méthyl-transférases (ou DNMTs pour DNA methyltransférases). Il y a trois DNMT connues chez les mammifères : DNMT1, DNMT3a et DNMT3b. DNMT1 est une ADN méthyltransférase « de maintien », qui permet de rétablir la méthylation des deux brins de l'ADN lors de la réplication (méthylation du brin néosynthétisé) ou de la réparation de l'ADN. DNMT3a et DNMT3b sont des ADN méthyltransférases « de novo », qui établissent le patron de méthylation (Cheng & Blumenthal, 2008).

De façon générale, la méthylation de l'ADN est considérée comme répressive pour la transcription conduisant à l'hétérochromatinisation de la région concernée. C'est le cas de gènes spécifiques de la lignée germinale dans les cellules somatiques, ou de gènes tissu-spécifiques dans les lignées où ils ne sont pas exprimés. La méthylation de l'ADN participe également à la mise en silence de séquences comme les transposons (Suzuki & Bird, 2008).

La répression par la méthylation de l'ADN peut résulter de différents mécanismes (**Figure 5**). La méthylation des CpG, au niveau de sa séquence cible, peut empêcher la liaison d'un facteur de transcription et donc inhiber l'initiation de la transcription. Les DNMTs elles-mêmes permettent le recrutement de complexes répresseurs contenant des activités de modification de la chromatine, comme des histones méthyltransférases, des histones déacétylases ou la protéine HP1 (Heterochromatin Protein 1) qui conduiront *in fine* à l'hétérochromatinisation de la région méthylée. Enfin, les dinucléotides CpG méthylés sont reconnus par des protéines spécifiques appelées MBP (pour Methyl-Binding Protein). Les MBP vont permettre le recrutement d'enzymes de modification de la chromatine conduisant à la mise sous silence du gène concerné (Bogdanovic & Veenstra, 2009; Cheng & Blumenthal, 2008; Clouaire & Stancheva, 2008). Les principales MBP connues, McCP2, MBD1, MBD2, MBD3 et Kaiso et les co-régulateurs qu'elles recrutent sont récapitulés dans le (tableau 1).

Protéines	Partenaires d'interaction	Effets de l'interaction
McCP2	Sin3A, HDACs	Répression transcriptionnelle
	c-ski, N-CoR	Répression transcriptionnelle
	HMGB1	Inconnu
	Sin3B, HDAC2	Répression transcriptionnelle
	Dnmt1	Cible de la maintenance de la méthylation de l'ADN
	H3K9 methyl-transférase	Répression transcriptionnelle
	Complexe CoREST	Répression des gènes neuronaux
	Brm (complexe SWI/SNF)	Répression transcriptionnelle
	YB-1	Epissage alternatif
	ATRX	Régulation épigénétique requise pour le développement neuronal
	HP1	Répression transcriptionnelle durant la différenciation musculaire
	CREB1	Activation transcriptionnelle
MBD1	MPG	Réparation de l'ADN
	Suv39h1-HP1	Répression transcriptionnelle
	MCAF1, MCAF2, SETDB1, CAF-1 p150	Répression transcriptionnelle, héritabilité des marques épigénétiques
	PML-RAR $\alpha$ , HDAC3	Mise en silence médiée par PML-RAR $\alpha$
MBD2	Complexe NuRD	Répression transcriptionnelle
	Sin3A	Répression transcriptionnelle
	Tax	Activation transcriptionnelle
	TACC3, HATs, pCAF	Activation transcriptionnelle
	GCNF	Mise en silence de Oct-4
	Dnmt1	Cible de la maintenance de la méthylation de l'ADN
	RFP	Renforcement de la répression transcriptionnelle
MBD3	complexe NuRD	Répression transcriptionnelle
	Dnmt1	Cible de la maintenance de la méthylation de l'ADN
	CDK2AP1, GCNF	Mise en silence de Oct-4
MBD4	Sin3A, HDAC1	Répression transcriptionnelle
	FADD	Surveillance du génome/apoptose
	MLH1	Réparation de l'ADN
	RFP	Renforcement de la répression transcriptionnelle
Kaiso	Tcf3	Suppression de la signalisation Wnt
	p120	Signalisation Wnt
	N-CoR	Répression transcriptionnelle

Tableau 1 : Partenaires interagissant avec les protéines liant l'ADN méthylé (Adapté de (Bogdanovic & Veenstra, 2009)).

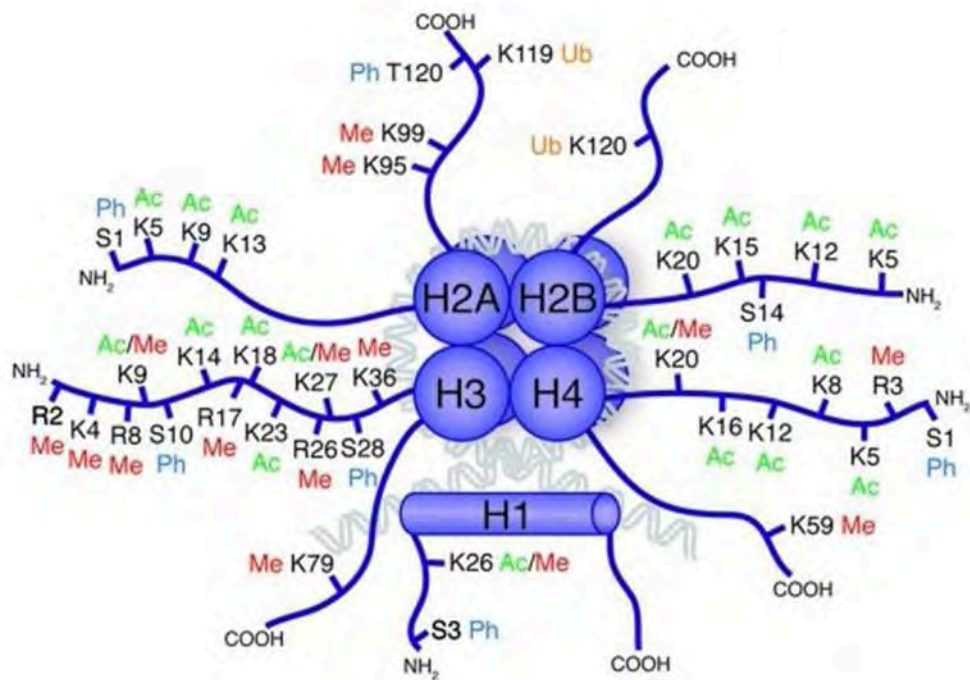
#### 4. Les Modifications post-traductionnelles des histones

Les histones peuvent subir différents types de modifications post-traductionnelles, qui sont étroitement liées à la compaction de la chromatine. Elles ont principalement lieu au niveau des queues N-terminales qui émergent du nucléosome, mais peuvent aussi être localisées au niveau du domaine globulaire (comme la méthylation de la lysine 79 de H3, ou H3K79me) ou de l'extrémité C-terminale (par exemple l'ubiquitination de H2A sur la lysine 119). On trouve différentes modifications des histones telles que l'acétylation, la méthylation, l'ubiquitination, la phosphorylation, la sumoylation ou encore l'ADP-ribosylation qui peuvent avoir lieu sur différents résidus (**Figure 6**) (Tollervey & Lunyak, 2012). Ces modifications sont mises en place et enlevées par des enzymes spécifiques. La présence de différentes combinaisons de modifications sur le génome est corrélée à un état fonctionnel donné de la chromatine. L'acétylation, la méthylation, l'ubiquitinylation et la phosphorylation des histones sont les marques les plus étudiées. Elles seront brièvement présentées ci-après en soulignant plus particulièrement leur rôle dans la régulation transcriptionnelle.

##### a) L'acétylation

L'acétylation des histones a lieu sur des résidus lysine, principalement sur des résidus de H3 et de H4, mais également sur les queues N-terminales de H2A et H2B. Elle est mise en place par des histones acétyltransférases (HAT) ou KAT pour les lysines (K), et enlevée par des histones déacétylases (HDAC) (Bannister & Kouzarides, 2011; Mujtaba *et al*, 2007; Yang & Seto, 2007). Au niveau des gènes, l'acétylation des histones est généralement corrélée à l'activation transcriptionnelle. Ainsi les histone-acétyltransférases sont généralement impliquées dans l'activation transcriptionnelle et les histones déacétylases dans la répression (Bannister & Kouzarides, 2011).

L'effet de l'acétylation passe par deux mécanismes. D'une part, l'ajout d'un groupement acétyl sur la lysine va provoquer une neutralisation de la charge sur le résidu, induisant ainsi une diminution de la force d'interaction histone-ADN et donc une ouverture de la chromatine. D'autre part, l'acétylation des histones va permettre le recrutement de facteurs



**Figure 6: Modifications post-traductionnelles des histones**

Représentation schématique des histones canoniques (H2A, H2B, H3 et H4) et de l'histone de liaison H1. Différentes modifications post-traductionnelles, la méthylation (Me), l'acétylation (Ac), la phosphorylation (Ph) pouvant avoir lieu sur les résidus indiqués sont montrées. (non exhaustif)

*Tollervey and Lunyak, 2012*

par l'intermédiaire d'un domaine d'interaction avec les lysines acétylées (Bannister & Kouzarides, 2011). Le Bromodomaine est le principal domaine connu de liaison aux résidus acétylés, cependant il a été montré que les résidus acétylés peuvent être reconnus également par des domaines PHD (Plant Homeodomain) (Musselman *et al*, 2012; Zeng *et al*, 2010). Les protéines effectrices qui reconnaissent les résidus méthylés vont à leur tour agir sur la chromatine pour la décompacter. On retrouve des bromodomaines dans des complexes de remodelage ATP dépendants tels que SWI2/SNF2, dans des HAT elles-mêmes comme Gcn5 ou p300, mais aussi dans la protéine TAFII 250 (TBP-Associated Factor) qui intervient dans l'initiation de la transcription. TAFII250 fait partie du complexe TFIID, qui initie l'assemblage de la machinerie de transcription par la polymérase II. La spécificité de reconnaissance des bromodomaines pour un résidu acétylé en particulier dépend de la séquence adjacente en acides aminés (Berger 2007; Mujtaba et al. 2007).

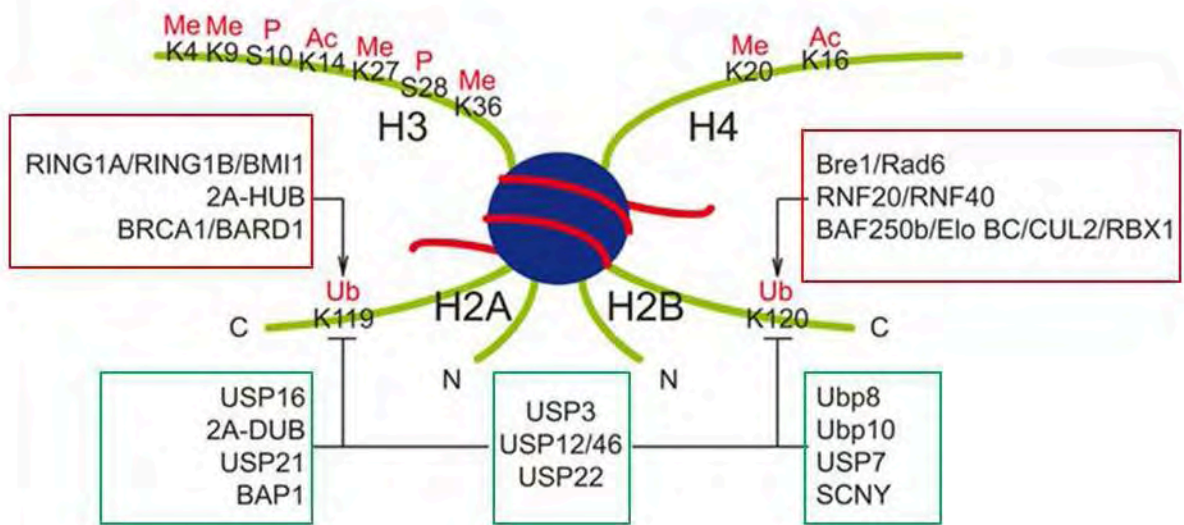
#### b) L'Ubiquitylation

L'ubiquitylation consiste en l'ajout d'une ou plusieurs ubiquitines (petite protéine de 76 aminés) sur un résidu lysine. L'ubiquitylation est catalysée par des ubiquitine ligases et peut être enlevée par des déubiquitinases (Cao & Yan, 2012).

Les histones H2A, H2B, H3, H4 et H1, ont été décrites comme pouvant être ubiquitylées. Cependant, les ubiquitylations d'histones les plus étudiées portent sur H2A (Lysine 119) et H2B (Lysine120). Elles ont été impliquées principalement dans la régulation transcriptionnelle (Cao & Yan, 2012) (**Figure 7**).

La forme majoritaire d'ubiquitylation de H2AK119 est la mono-ubiquitylation. Elle a été associée à la répression transcriptionnelle. On la retrouve notamment enrichie dans les régions satellites de l'hétérochromatine et sur le chromosome X inactivé (de Napoles *et al*, 2004; Fang *et al*, 2004). L'ubiquitylation de H2AK119 est associée à la répression transcriptionnelle. La première ubiquitine ligase de H2A identifiée est RING1B, une sous unité du complexe répresseur Polycomb impliqué dans la répression des gènes homéotiques au cours du développement. RING1B est requise pour la répression par le complexe Polycomb (Cao *et al*, 2005). Depuis, plusieurs ubiquitine ligases de H2AK119 ont été impliquées dans la répression transcriptionnelle tandis que les déubiquitinases de H2AK119 ont été impliquées dans l'activation de la transcription (Cao & Yan, 2012). Le mode d'action de H2AK119Ub dans la répression transcriptionnelle a été étudié. H2AK119Ub empêche notamment la di et la tri-méthylation sur H3K4, marques associées à l'activation transcriptionnelle (Nakagawa *et al*, 2008). H2AK119Ub





**Figure 7 : Enzymes de l'ubiquitination des histones H2A et H2B**

L'ubiquitinylation sur les queues C-terminales de H2A (lysine 119) et H2B (Lysine120) a été extensivement étudiée

Les ubiquitine ligases (encadrées en rouge) et les déubiquitinases (encadrées en vert) sont représentées

*Adapté de Cao et al. 2012*



inhibe l'élongation de la transcription en restreignant l'ARN Pol-II au promoteur.  
L'ubiquitinylation H2AK119 Ub

empêche l'éviction du dimère H2A-H2B du nucléosome, éviction nécessaire au passage de l'ARN polymérase (Zhou *et al*, 2008).

Quant à l'ubiquitinylation de H2B120, on la retrouve dans la région codante de gènes transcriptionnellement actifs. Il a été montré que H2B120Ub favorise l'activation transcriptionnelle en permettant la mise en place des méthylations sur H3K4, sur H3K79 et l'acétylation sur H4, marques associées à l'activation transcriptionnelle (Soares & Buratowski, 2013) .

En dehors de la transcription, l'ubiquitinylation de H2A a été impliquée dans la réparation de l'ADN. Par exemple, la poly-ubiquitinylation de H2A et du variant H2AX sur leur lysine K63 est requise pour la réparation des dommages à l'ADN (Doil *et al*, 2009; Kolas *et al*, 2007; Stewart *et al*, 2009). L'ubiquitinylation de H2B a également été impliquée dans la réparation des dommages à l'ADN (Nakamura *et al*, 2011). Pour une revue détaillant les acteurs et le mode d'action de l'ubiquitinylation de H2A et H2B dans la transcription et la réparation de l'ADN voir (Cao & Yan, 2012).

### c) La Phosphorylation

Les histones peuvent être phosphorylées sur les résidus sérine, thréonine et tyrosine. La phosphorylation des histones et des variants d'histone a été impliquée dans la régulation de divers processus chromatinien incluant la transcription, la réparation de l'ADN et la ségrégation des chromosomes (Rossetto *et al*, 2012). Par exemple, la phosphorylation de la Sérine 129 du variant d'histone H2AX est impliquée dans la signalisation et la réparation des dommages à l'ADN. La phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 (H3S10) participe à la ségrégation des chromosomes au cours de la mitose (Wei *et al*, 1999). Les phosphorylations sur H3S10, H3S11 et H3S28 ont été impliquées dans l'activation transcriptionnelle (Lo *et al*, 2001; Metzger *et al*, 2008).

La phosphorylation coopère avec d'autres modifications des histones dans la régulation des processus chromatinien. Dans l'activation transcriptionnelle par exemple, La phosphorylation sur les sérines H3S10 et H3S11 permet le recrutement de l'histone acétyltransférase GCN5 et l'activation transcriptionnelle *via* l'acétylation de H3K9 et H3K14

(Lo *et al*, 2001; Metzger *et al*, 2008). La phosphorylation de H3S28 empêche la répression transcriptionnelle par le complexe Polycomb en entraînant la déméthylation de la lysine K27 adjacente, H3K27 devant être méthylée pour le recrutement du complexe PRC1 (Lau & Cheung, 2011). Lors de la ségrégation des chromosomes en mitose, des données suggèrent que H3S10 agit en modulant la tri-méthylation sur H3K9me3. En effet, l'entrée des cellules en mitose s'accompagne de l'éviction des protéines HP1 de la chromatine (Minc *et al*, 1999). Le recrutement de HP1 se fait via la méthylation de la lysine H3K9 adjacente à H3S10. Il a été montré que la phosphorylation de H3S10 est suffisante pour permettre l'éviction des protéines HP1 de la chromatine (Fischle *et al*, 2005), suggérant un liant négatif entre la méthylation sur H3K9me3 et la phosphorylation sur H3S10.

De nombreuses études montrent le rôle de la phosphorylation des histones dans la régulation de la transcription et des processus chromatinien évoqués ci-dessus. Elles ont fait l'objet d'une élégante revue par Rossetto et collaborateurs (Rossetto *et al*, 2012).

#### d) La méthylation des histones

La méthylation des histones est mise en place par des histones méthyltransférases et peut avoir lieu sur des lysines (K) ou des arginines (R) (Black *et al*, 2012).

Les lysines peuvent être mono-, di- ou triméthylées par des histones lysines méthyltransférases (KMT). Les sites privilégiés de méthylation sur lysine dans les cellules de mammifères sont les lysines 4, 9, 27, 36, et 79 de l'histone H3 ainsi que la lysine 20 de l'histone H4. Depuis quelques années, il a été démontré que la méthylation des lysines, est réversible, avec la mise en évidence des déméthylases spécifiques des lysines (KDM) (Black *et al*, 2012; Shi *et al*, 2004). La méthylation des histones sur les lysines et son rôle dans la régulation transcriptionnelle ont fait l'objet de ma thèse et seront abordées de façon plus détaillée dans le chapitre « méthylation des lysines ».

La méthylation des histones sur les arginines est caractérisée quant à elle par l'ajout d'un ou deux groupements méthyle, la diméthylation pouvant être symétrique ou asymétrique. Elle est mise en place par des enzymes spécifiques de résidu, les PRMT (Protein Arginine Methyl Transferase), qui sont classées en deux groupes : les PRMT de type I catalysent la diméthylation asymétrique tandis que les PRMT de type II sont responsables de la

diméthylation symétrique. La seule histone déméthylase de résidus arginine identifiée à ce jour est JMJD6 qui déméthylerait H3R2 et H4R3 (Chang *et al*, 2007). Cependant cette étude est controversée. En effet Webby *et al*. ont montré que l'activité catalytique dominante de JMJD6 est l'hydroxylation des lysines et ils n'ont pu observer aucune déméthylation d'arginine par JMJD6 (Webby *et al*, 2009). L'hypothèse que JMJD6 serait une arginine hydroxylase plutôt qu'une arginine déméthylase a été appuyée par la résolution de sa structure cristallographique (Mantri *et al*, 2010).

Le retrait de la méthylation des arginines peut s'effectuer par la déimination du résidu arginine en citrulline par l'action des enzymes PAD (Peptidyl Arginine Déiminase). Dans ce cas il n'est plus possible de modifier le résidu par méthylation par la suite (Cuthbert *et al*, 2004; Wang *et al*, 2004; Zhang *et al*, 2012).

Qu'elle soit sur lysine ou arginine, la méthylation n'affecte pas la charge de l'histone et donc elle ne modifie pas l'interaction électrostatique entre l'ADN et les histones. Le résidu méthylé sera reconnu par des protéines ou complexes effecteurs qui possèdent des domaines de liaison spécifiques pour des résidus méthylés (tableau2). Ces effecteurs comprennent des complexes de remodelage de la chromatine, des protéines architecturales telles que HP1 (Heterochromatin Protein 1, capable d'établir l'hétérochromatine), les différentes machineries de transcription, de réparation de l'ADN, ou de réplication mais également d'autres activités (acétyl-transférases, déacétylases, méthyltransférases, déméthylases), capables de mettre en place d'autres modifications de la chromatine, en cohérence avec la marque méthylée et le contexte chromatinien (Bannister & Kouzarides, 2011; Black *et al*, 2012). De par le grand nombre de résidus méthylés et des activités effectrices qu'elle va recruter, la méthylation des histones a été impliquée dans presque tous les mécanismes nécessitant l'accès à l'ADN (Transcription, réplication, Réparation de l'ADN, formation de l'hétérochromatine)(Bannister & Kouzarides, 2011; Black *et al*, 2012).

### Méthylation sur lysines

ADD	H3K9me3
Ankyrin	H3K9me2, H3K9me1
BAH	H4K20me2
Chromo-barrel	H3K36me3, H3K36me2, H4K20me1, H3K4me1
Chromodomain	H3K9me3, H3K9me2, H3K27me3, H3K27me2
DCD	H3K4me3, H3K4me2, H3K4me1
MBT	H3Kme1, H3Kme2, H4Kme1, H4Kme2
PHD	H3K4me3, H3K4me2, H3K9me3
PWWP	H3K36me3, H4K20me1, H4K20me3, H3K79me3
TTD	H3K4me3, H3K9me3, H4K20me2
Tudor	H3K36me3
WD40	H3K27me3, H3K9me3
zf-CW	H3K4me3

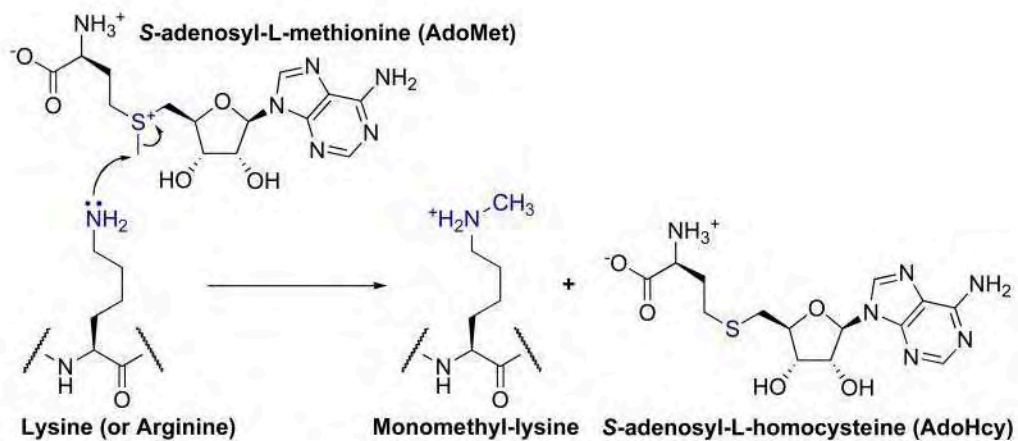
### Méthylation sur Arginines

ADD	H4R3me2s
Tudor	H3Rme2, H4Rme2
WD40	H3R2me2

**Tableau 2 : Domaine de liaison aux résidus méthylés et spécificité du niveau de méthylation**

#### e) L'hypothèse du code des histones

L'hypothèse du code des histones, avancée en 2001, propose que la combinaison des différentes modifications va constituer un code qui une fois décrypté par des protéines lectrices permettra de dicter à la machinerie de transcription l'issue transcriptionnelle appropriée (Jenuwein and Allis 2001). Les protéines lectrices sont celles contenant un domaine de reconnaissance des résidus modifiés : bromodomaines, domaine PHD pour la liaison aux résidus acétylés, chromodomaines, domaines PHD et TUDOR pour les résidus méthylés (Bannister & Kouzarides, 2011; Taverna *et al*, 2007). Les études à grande échelle du profil des différentes modifications (et de la liaison de divers facteurs) sur le génome entier par des techniques dérivées de l'immunoprécipitation de chromatine ou ChIP (ChIP on chips, ChIP-seq) permettent de mieux comprendre la combinatoire du code des histones ainsi que ses conséquences fonctionnelles. L'analyse des données à grande échelle montre que le nombre de combinaisons différentes observées sur le génome est beaucoup moins important que celui attendu en théorie si les modifications étaient présentes au hasard, étant donné la diversité des modifications post-traductionnelles d'histones décrites (Karlic *et al*, 2010; Kharchenko *et al*, 2011; Wang *et al*, 2008). Ceci implique que la mise en place du code s'effectue de manière coordonnée grâce à un dialogue entre les marques, la présence de certaines influant sur la déposition ou l'éviction d'autres. Ainsi, différents mécanismes moléculaires impliquant les enzymes de modifications sont mis en place pour assurer cette coordination. L'analyse de ce dialogue entre les marques (appelé histones crosstalks) ainsi que les mécanismes moléculaires sous-jacents faisant intervenir les histones déméthylases ont fait l'objet de revues récentes (Molina-Serrano *et al*, 2013; Rothbart & Strahl, 2014; Verrier *et al*, 2011b).



### Figure 8: Mécanisme réactionnel des histones méthyltransférases

Ce mécanisme est commun aux histones méthyltransférases à domaines SET et à DOT1. le donneur de méthyl est la S-adenosyl-L-methionine (AdoMet)

*Smith and Deanu 2009*

## B. La méthylation des histones sur les lysines

### I. Mise en place et enlèvement

Comme précédemment énoncé, les résidus lysines des histones peuvent être mono-, di, ou tri-méthylés. Ces modifications sont réversibles. Elles sont mises en place par et enlevées par des enzymes spécifiques de résidus et du degré de méthylation : les histone méthyltransférases et les histone déméthylases (Smith & Denu, 2009).

#### 1. Les histone méthyltransférases

La très grande majorité des histone Lysine méthyltransférases (KMT) sont des protéines à domaine SET (Suvar3-9 and Enhancer of zeste) du nom de leur domaine catalytique constitué de 130 acides aminés qui catalyse la réaction de méthylation en utilisant comme donneur de méthyl la S-adenosyl-méthionine (SAM ou AdoMet) (**figure 8**). La seule KMT connue qui ne possède pas de domaine SET est DOT1 spécifique de H3K79. DOT1 utilise également la SAM comme donneur de méthyl et son mécanisme enzymatique est proche de celui des KMT à domaine SET. Les KMT sont hautement spécifiques pour des résidus donnés (Black *et al*, 2012). Plus d'une trentaine d'histone méthyltransférases ont été identifiées à ce jour chez les mammifères. Leurs substrats sont récapitulés dans le tableau 3.

#### 2. Les histone déméthylases

Du fait que sa demi-vie est proche de celle des histones, il a longtemps été admis que la méthylation ne pouvait être enlevée qu'en remplaçant l'histone méthylée par une autre non modifiée. La première histone déméthylase LSD1/KDM1 a été identifiée seulement en 2004 (Shi *et al*, 2004). Cette découverte a ouvert la voie à l'étude de la méthylation des histones comme un processus hautement dynamique ainsi que sur l'implication des histone déméthylases dans la régulation de cette dynamique et de son impact sur les processus chromatinien.

Il existe deux familles d'histone déméthylases. La première est la famille LSD1. Elle est constituée de seulement deux membres, LSD1 et son homologue LSD2 qui sont des amine oxydases qui utilisent comme co-facteur la FAD (Flavine Adenine Dinucleotide). Ces

enzymes peuvent déméthyliser des formes mono- et di-méthylées de H3K4. Le mécanisme de déméthylation implique la formation d'un intermédiaire (Imine) qui ne peut être formé à partir de résidus triméthylés (**figure 9**).



Nomenclature	Symbole officiel	Substrats histones	substrats non histone
KMT1A KMT1B  KMT1C  KMT1D KMT1E KMT1F	SUV39H1 SUV39H2  G9a/EHMT2  GLP/EHMT1 SETDB1 SETDB2	H3K9me2/3 H3K9me2/3  H3K9me1/2-H3K27me1/2  H3K9me1/2 H3K9me2/3 H3K9me2/3	p53, G9a, C/EBPb, Reptin, RAR $\alpha$ , MyoD DNMT1, CDYL1, WIZ, ACINUS, MEF2D p53 Tat, ING2, UBF
KMT2A KMT2B KMT2C KMT2D KMT2E KMT2F KMT2G KMT2H	MLL1 MLL2 MLL3 MLL4 MLL5 SETD1A SETD1B ASH1L	H3K4me1-3 H3K4me1-3 H3K4me1-3 H3K4me1-3 H3K4me1-3 H3K4me1-3 H3K4me1-3 H3K4; K9; K27 me1-3	
KMT3A KMT3B KMT3C KMT3D  KMT3E KMT3F KMT3G	SETD2 NSD1 SMYD2 SMYD1  SMYD3 NSD3/WHSC1L1 NSD2/WHSC1	H3K36me3 H3K36; K20 me1/2 H3K36me1/2  H3K4me2/3; H4K5me; H4K20 H3K4me2/3 H3K4me1/2; H3K36me1/2 H4K20 me1/2; H3K27me1-3	NF-kB p53, Rb  VEGFR
KTM4	DOT1L	H3K79 me1-3	
KMT5A KMT5B KMT5C	SET8/PR- SET7/SETD8 SUV420H1 SUV420H2	H4K20 me1 H4K20me2/3 H4K20me2/3	p53
KMT6A KMT6B	EZH2 EZH1	H3K27me1-3 H3K27me1-3	GATA4, ROR $\alpha$
KMT7	SET7/SET9/SETD7	H3K4me2	TAF10, p53, ER $\alpha$ , DNMT1, Rb, TAT, PCAF, E2F1, AR, STAT3, p65/RelA
KMT8A KMT8B KMT8C KMT8D KMT8E KMT8F	PRDM2/RIZ1 PRDM9 PRDM6 PRDM8 PRDM3 PRDM16	H3K9me1-3 H3K4me3 H3K4me3 H3K9me2 H3K9me1 H3K9me1	

Tableau 3 : Les histones Lysine méthyltransférases et leurs substrats

La deuxième famille comprend toutes les autres histone déméthylases connues à ce jour (Mosammaparast & Shi, 2010). Il s'agit des histones déméthylases à domaine JMJC qui sont des dioxygénases utilisant le  $\text{Fe}^{2+}$  et le 2-oxoglutarate (ou  $\alpha$ -cetoglutarate) comme cofacteur. Le mécanisme catalytique de ces enzymes permet la déméthylation de résidus triméthylés (**figure 9**).

Près d'une trentaine de KDMs sont connues à ce jour. A l'instar des histone méthyltransférases, elles sont spécifiques pour des résidus donnés et leur niveau de méthylation (Black *et al*, 2012; Mosammaparast & Shi, 2010). Le tableau 4 en dresse un récapitulatif avec leur(s) substrat(s) spécifique(s). Les bases structurales de la spécificité de substrat et du degré de méthylation des KMT ainsi que des KDMs sont abordées dans la rubrique suivante.

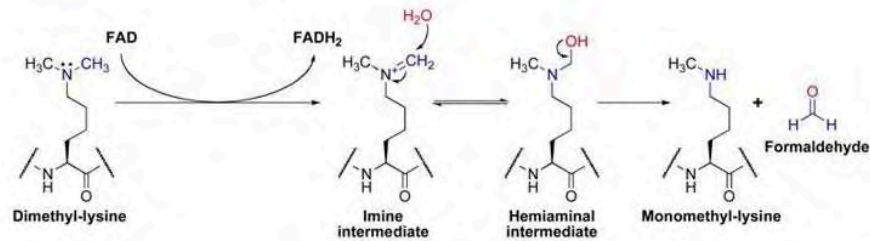
### 3. Spécificité de substrat des KMT et des KDM, apports de la cristallographie

L'analyse des structures cristallographiques des KMT et des KDMs a permis de mieux comprendre leur spécificité pour les lysines méthylées et leur degré de méthylation (Black *et al*, 2012; Cramer, 2014; Mosammaparast & Shi, 2010). En effet cette spécificité dépend en grande partie de la capacité de l'enzyme à reconnaître et à accommoder son substrat. Ce chapitre se propose par quelques exemples de montrer comment la structure des KMT/KDM et leurs protéines partenaires participent à la spécificité de l'enzyme pour une lysine donnée ou son degré de méthylation.

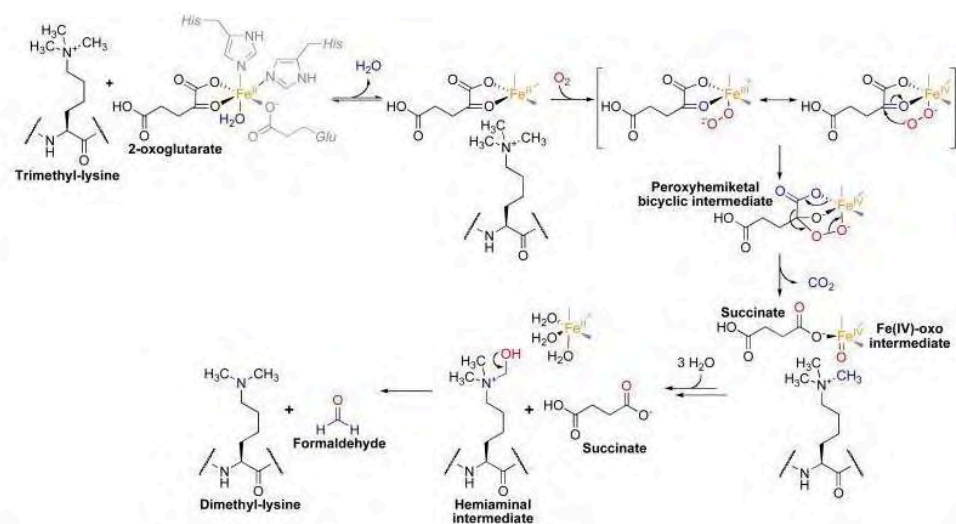
#### a) Les KMT

La première lumière sur la spécificité de substrat a été apportée par la résolution de la structure cristallographique de KMT7 (SET7/SET9). L'accès à la chaîne latérale de la lysine par le domaine SET des KMT se fait via un canal étroit appelé le pore de méthylation. Le pore de méthylation est tapissé de chaînes latérales d'acides aminés qui sont importantes pour la méthylation de la lysine. Par exemple, Les mutations d'acides aminés du pore de méthylation de KMT7 changent son activité qui de H3K4 mono-méthyltransférase passe à H3K4 triméthyltransférase (si on mute la Tyr 245), ou à H3K9 diméthyl-transférase (si on mute la Tyr

### Famille LSD1



### Famille JmjC



### Figure 9: Mécanismes réactionnels des histone déméthylase

Les deux types de mécanismes enzymatiques sont présentés. La famille LSD1 utilise comme co-facteur le FAD, L'imine intermédiaire ne peut se former à partir d'une lysine triméthylée. La famille des histone déméthylases à domaine JMJC utilise comme cofacteurs le 2-oxoglutarate ( $\alpha$ -cétoglutarate) et le Fer.

*Smith and Deano 2009*

305) (Dillon *et al*, 2005). Ainsi la composition en acides aminés du pore de méthylation module la capacité d'une KMT donnée à méthyler un substrat spécifique.

La capacité d'une KMT à méthyler un substrat donné peut également être modulée par les partenaires de celle-ci. In vitro, KMT2A/MLL1 est capable *in vitro* de mono- ou di-méthyler H3K4. Il a été montré in- vitro et *in-vivo*, qu'en présence de ses partenaires Ash2L, RbBP5 et WDR5 qui ne possèdent pas d'activité catalytique, elle peut également tri-méthyler ce résidu (Dou *et al*, 2006).

Nomenclature	Symbole Officiel	Substrats histones	Substrats non histones
KDM1A KDM1B	KDM1A/LSD1 KDM1B/LSD2/	H3K4me1/2; H3K9me1/2 H3K4me1/2	p53, E2F1, DNMT1, STAT3, MEF2D
KDM2A KDM2B	KDM2A/FBXL11/JHDM1A KDM2B/FBLX10/JHDM1B	H3K36me1/2 H3K36me1/2; H3K4me3	p65, NF-kB
KDM3A KDM3B KDM3C	KDM3A/JHDM2A KDM3B/JHDM2B JMJD1C	H3K9me1/2 ? ?	
KDM4A KDM4B KDM4C KDM4D	KDM4A/JMJD2A/JHDM3A KDM4B/JMJD2B KDM4C/JMJD2C/GASC1 KDM4D/JMJD2D	H3K9me2/3; H3K36me2/3 H3K9me2/3; H3K36me2/3 H3K9me2/3; H3K36me2/3 H3K9me2/3; H3K36me2/3	G9a (testé seulement sur peptides)
KDM5A KDM5B KDM5C KDM5D	KDM5A/JARID1A/RBP2 KDM5B/JARID1B/PLU1 KDM5C/JARID1C/SMCX KDM5D/JARID1D	H3K4me2/3 H3K4me2/3 H3K4me2/3 H3K4me2/3	
KDM6A KDM6B	KDM6A/UTX KDM6B/JMJD3	H3K27me2/3 H3K27me2/3	
KDM7A KDM7B KDM7C	JHDM1D/KIAA1718 PHF8/JHDM1F PHF2/JHDM1E	H3K9me1/2; H3K27me1/2 H3K9me1/2; H4K20me1 H3K9me2	ARID5B
KDM8	JMJD5	H3K36me2	

**Tableau 4 : Les histones Lysine déméthylases et leurs substrats**

## b) Les KDM

Comme pour les KMT, des partenaires et des résidus clés de l'activité et de la spécificité de substrat des KDM ont été identifiés. Par exemple, la co-cristallisation de LSD1 avec son complexe partenaire Co-REST a montré que l'interaction avec ce dernier permettait recruter LSD1 au nucléosome afin que celle-ci puisse déméthyle son substrat. En effet *in vitro* LSD1 est capable de déméthyle H3K4me2 sur des peptides mimant la queue de l'histone H3 mais pas sur des nucléosomes reconstitués. Cependant en présence de Co-REST recombinant, LSD1 peut déméthyle H3K4me dans les nucléosomes. Cette capacité à déméthyle des nucléosomes est perdue par les formes de LSD1 mutées pour leur capacité à interagir avec Co-REST (Lee *et al*, 2005; Shi *et al*, 2005; Yang *et al*, 2006). LSD1 a été identifiée pour sa capacité à déméthyle H3K4me2 et me1. Cependant il a été montré *in vitro* et *in vivo* qu'en présence du récepteur aux androgènes, LSD1 est capable de déméthyle H3K9me2 (Metzger *et al*, 2005).

Le domaine catalytique des KDM à domaine JMJC est un tonneau Beta qui coordonne les cofacteurs (2OG et Fe<sup>2+</sup>) (Cramer, 2014). La structure cristallographique de l'histone déméthylase JMJD2A/KDM4A a été extensivement étudiée et a permis de mieux comprendre la spécificité de substrat et de degré de méthylation des KDMs. JMJD2A/KDM4A est spécifique des formes di- et tri-méthylées des lysines H3K9 et H3K36 avec une forte activité contre les formes triméthylées et une plus faible activité contre les formes diméthylées. Quant à JMJD2D elle présente une forte activité aussi bien contre les formes triméthylées que les formes di-méthylées. Un motif de deux acides aminés appelé  $\beta 5$  a été impliqué dans la spécificité pour le niveau de méthylation. En effet la mutation du  $\beta 5$  de JMJD2A (Ser-Thr) en celui de JMJD2D (Ala-Ile) change la spécificité de JMJD2A pour les niveaux de méthylation en celle de JMJD2D et inversement (Chen *et al*, 2006). De plus, la mutation de l'isoleucine 71 de JMJD2A n'a pas d'effet *in vitro* sur la déméthylation de H3K9 mais diminue fortement la déméthylation de H3K36 (Hillringhaus *et al*, 2011).

La cristallisation de JMJD2A avec une queue d'histone monométhylée sur H3K9 a montré que JMJD2A ne déméthyle pas la forme monométhylée parce que le groupement méthyle est dans une conformation où il est orienté à l'opposé de l'atome de fer dans le site catalytique. La queue d'histone apporte également de la spécificité puisque les résidus

avoisinant la lysine à déméthyliser sont également impliqués. Ainsi des motifs diglycine après la lysine 9 (H3G12 - H3G13) et avant la lysine 36 (H3G33-H3G34) permettent la flexibilité du peptide pour accommoder la poche catalytique de l'enzyme. La mutation de ces glycines ou leur mutation en proline entraîne une baisse significative de l'activité déméthylase de JMJD2A (Wilson, 2007) .

Ainsi, comme pour les KMT, la spécificité de substrat des KDM dépend de résidus présents sur l'enzyme, de ses partenaires mais également de la lysine à déméthyliser et de son environnement.

## II. Rôles de la méthylation des histones sur lysines

De par sa capacité à moduler la structure de la chromatine la méthylation des histones intervient dans la régulation des processus nécessitant un accès à l'ADN. Dans ce paragraphe, je décris le rôle de la méthylation des histones sur lysines dans des processus chromatiniens clés. J'ai choisi d'aborder de façon succincte, l'implication de la méthylation des histones sur lysine dans la mise en silence de l'hétérochromatine, l'épissage et la réplication. Le rôle de la méthylation dans la régulation de la transcription, qui constitue le cœur de mon travail de thèse sera abordé de manière plus complète. Enfin, une brève rubrique abordera l'implication de la méthylation dans la régulation de protéines autres que les histones.

### 1. La mise en silence de l'hétérochromatine

De la levure à l'homme, les régions de l'hétérochromatine sont caractérisées par un très fort enrichissement en H3K9me3/me2 et H4K20me3 (Barski *et al*, 2007). La régulation de la mise en silence de ces régions est importante pour le maintien de la stabilité du génome. Chez la drosophile, la perte de la méthylation de H3K9 se traduit par l'apparition de dommages à l'ADN dans l'hétérochromatine et des défauts de mitose. De même, chez la souris la déplétion de suv39H1/H2 entraîne la perte de H3K9me3 dans l'hétérochromatine péracentrique, un rallongement des télomères et une augmentation de la fréquence de recombinaison des télomères. On observe un phénotype similaire dans les MEFs déplétées pour suv420H1/H2, KMT spécifique de H4K20 (Benetti *et al*, 2007; Garcia-Cao *et al*, 2004; Peters *et al*, 2001).

Une étude récente a montré que la mono-méthylation de H3K9 sur les histones libres par les KMT PRDM3 et PRDM16 dans le cytoplasme est requise pour la formation de l'hétérochromatine. Ces histones mono-méthylées sont incorporées dans l'hétérochromatine où elles seront ensuite tri-méthylées. La déplétion de PRDM3 et PRDM16 dans les cellules de souris se traduit par la perte de H9K9me3 et des défauts de formation de l'hétérochromatine (Pinheiro *et al*, 2010).

## 2. L'épissage

L'analyse des données à grande échelle montre que les exons et les introns se distinguent par leur profil de méthylation. Par exemple dans une ORF, les exons qui sont exprimés sont enrichis en H3K4me3, H3K36me3, H4K20me1 et H3K79me1, tandis que les introns sont enrichis en H3K4me1 et H3K36me1 (Dhami *et al*, 2010; Spies *et al*, 2009). Ces observations suggèrent un rôle fonctionnel de ces modifications d'histone dans les mécanismes d'épissage.

Il a en effet été montré que les profils de méthylation sur H3K36me3 et H3K4me3 permettent de réguler l'inclusion ou l'exclusion d'exons lors de l'épissage de l'ARNm de FGFR2 épissés alternativement (Luco *et al*, 2010). Cette régulation passe par le recrutement de la protéine PTBP1 (Polypyrimidin Tract-Binding Protein). Il a également été montré que H3K4me3 influence l'épissage alternatif en modulant le recrutement de CHD1 (Sims *et al*, 2007). De plus l'enrichissement de H3K9me3 dans la région codante de certains gènes a été impliqué dans l'épissage alternatif (Saint-Andre *et al*, 2011). Ces résultats montrent que la méthylation des histones joue un rôle important dans la composition des transcrits en recrutant directement ou indirectement des facteurs d'épissage.

## 3. La réplication :

La réplication de l'ADN comprend quatre étapes principales. La première est la reconnaissance des origines de réplication par le complexe ORC (Origine Recognition Complex). Il y aura ensuite recrutement au site de liaison de ORC des protéines CDC6 (Cell division Control 6) et MCMs (MiniChromosome Maintenance) pour former le complexe de pré-réplication (pre-RC pour pre-Replication Complexe). Les origines de réplication sont ensuite « activées » par des kinases comme CDC45. L'élongation de la réplication peut ensuite commencer. Chez les mammifères, la méthylation des histones notamment sur les lysines H4K20, H3K4 et H3K79 a été impliquée dans la régulation à différentes étapes du processus de réplication (Rivera *et al*, 2014).



Les formes di- et tri- méthylées de H4K20 ont été impliquées dans le recrutement du complexe ORC. Par exemple, le domaine BAH de la sous-unité ORC1 interagit avec H4K20me2 et est requis pour le recrutement de ORC1 à la chromatine, tandis que la sous-unité ORCA interagit avec H4K20me3 (Beck *et al*, 2012a; Kuo *et al*, 2012). Il a été montré que le recrutement du pre-RC s'accompagne d'une augmentation de H4K20me1 aux origines de réplication (Beck *et al*, 2012b). Chez les mammifères, la seule KMT connue spécifique de H4K20me1 est PR-Set7 (KMT5A). L'adressage ectopique de PR-Set7 conduit au recrutement de protéines du pre-RC à un locus connu pour ne pas contenir d'origine de réplication. La protéine PR-set7 est recrutée aux origines de réplication. Elle est ensuite dégradée pendant la phase S. L'inhibition de cette dégradation entraîne de la re-Réplication (Tardat *et al*, 2010). Plus tard, il a été montré que l'induction du recrutement du pre-RC et de la re-réplication par PR-set est dépendante de Suv4-20h (capable de di- et tri- méthyliser H4K20) et que la sous-unité ORCA du complexes ORC peut se lier à H4K20me3 (Beck *et al*, 2012a). Ceci suggère un mécanisme processif dans lequel H4K20 serait mono-méthylée par PR-Set7 puis di- ou tri-méthylée par Suv4-20 pour permettre le recrutement du pre-RC.

Des études indiquent que la méthylation de H3K4 régule négativement l'activation des origines de réplication en empêchant le recrutement de CDC45. En effet il a été montré in vitro que la méthylation sur H3K4 empêche le recrutement de CDC45 sur des peptides mimant la queue de H3. De plus, sur le locus beta globine méthylé sur H3K4 il existe une origine de réplication qui n'est pas activée. Cependant la surexpression d'un mutant catalytiquement inactif de MLL (H3K4 méthyltransférase) entraîne l'activation de cette origine de réplication (Liu *et al*, 2010a).

H3K79me2 a également été impliquée dans la régulation de la réplication où elle servirait à empêcher la re-réplication. En effet, des études à l'échelle du génome dans les cellules humaines K562 montrent un enrichissement de H3K79me3 à des sites d'initiation de la réplication La déplétion de la protéine DOT1L responsable de la méthylation de H3K79 entraîne de la re-réplication certaines régions du génôme (Fu *et al*, 2013).

Indirectement, la tri- méthylation de H3K9 a été impliquée dans la régulation de la réplication. En effet, les régions de l'hétérochromatine constitutive, hautement compactées, sont répliquées de façon tardive. Les protéines HP1 (Heterochromatin Protein 1) qui permettent la mise en place et le maintien de l'hétérochromatine sont recrutées grâce à leur chromodomaine par H3K9me3 mise en place par la KMT SUV39H1. L'histone déméthylase

JMJD2A (Spécifique de H3K9me3/2) a été impliquée dans la régulation du timing de réplication. JMJD2A est requise pour la décompaction de ces régions de l'hétérochromatine au cours de la réplication tardive où elle entraîne la déméthylation de H3K9me3 et l'éviction de HP1 $\gamma$ . La surexpression de JMJD2A entraîne un raccourcissement de la phase S. Ce phénotype est réversé en surexprimant également HP1  $\gamma$  (Black *et al*, 2010). Ce rôle dans la réplication a été appuyé par une seconde étude qui montre que la surexpression de JMJD2A entraîne une augmentation du nombre de copies de loci (1q12, 1q21 et Xq13.1) amplifiés dans les cancers. La surexpression de JMJD2A conduit à la décompaction de ces loci et au recrutement de la machinerie de réplication. Ce phénotype est inversé en surexprimant HP1 $\gamma$  et SUV39H1 (Black *et al*, 2013).

Beaucoup reste à savoir sur les mécanismes impliquant la méthylation des lysines, les KMT et les KDMs dans la régulation de la réplication. Améliorer notre compréhension de ces mécanismes sera sans aucun doute en enjeu majeur dans les années à venir.

#### 4. La Méthylation des lysines dans la régulation de la transcription

##### a) Les marques de méthylation et la régulation de la transcription

La méthylation des histones régule la transcription en modulant d'une part le niveau de compaction de la chromatine et d'autre part le recrutement de la machinerie transcriptionnelle. Cette régulation est complexe car l'impact sur la transcription sera différent en fonction du résidu méthylé, du niveau de méthylation (mono, di ou tri ) et de la position du nucléosome sur le gène (Bannister & Kouzarides, 2011; Black *et al*, 2012).

Les résidus méthylés sur les histones concernent majoritairement les queues N-terminale des histones qui émergent du nucléosome. Des résidus du domaine globulaire peuvent également être méthylé. C'est le cas de la lysine H3K79 de l'histone H3 (Tessarz & Kouzarides, 2014). Cinq lysines de l'histone H3 H3K4, H3K9, H3K27 (queue de H3) et H3K79 (Domaine globulaire), et une de la queue de H4, H4K20 ont été identifiées comme étant méthylées et dont la méthylation est associée à la régulation de la transcription. Il s'agit des lysines H3K4 et H3K36 (queue de H3), H3K79 (domaine globulaire), Chez les eucaryotes supérieurs, du fait du grand nombre de gènes qui codent pour les histones, il est impossible de dépléter ou de muter des histones (Ederveen *et al*, 2011) . Le rôle assigné à une modification d'histone dans la transcription est donc basé sur la corrélation entre la présence de cette marque et l'état transcriptionnel d'une part, et d'autre part sur l'effet obtenu lorsque l'on module les enzymes qui mettent en place ou enlèvent cette marque. Les méthylations sur H3K4, H3K36, et H3K79 sont ainsi associées aux gènes actifs et à l'activation transcriptionnelle tandis que les méthylation sur H3K9, H3K27 et H4K20 sont associées aux gènes réprimés et à la répression transcriptionnelle. Dans ce chapitre je présente ces différentes marques et leur implication dans la régulation de la transcription.

##### i. Marques de méthylation généralement associées aux gènes actifs : H3K4 et H3K36

##### Méthylation sur H3K4 :

La tri-méthylation sur H3K4 (H3K4me3) est une des première méthylation d'histones identifiée et caractérisée (Bannister & Kouzarides, 2011; Black *et al*, 2012). H3K4me3 est une marque majeure associée à l'activation transcriptionnelle. En effet, les analyses à

l'échelle du génome montrent qu'elle est enrichie au promoteur et au site d'initiation de la transcription des gènes actifs (Barski *et al*, 2007). Comme décrit plus haut dans la rubrique méthylation des histones, les résidus méthylés sont reconnus par des effecteurs qui vont réguler la transcription (Black *et al*, 2012). Chez les mammifères, H3K4me3 est reconnue notamment par le domaine PHD de la protéine TAF3 qui appartient à la sous unité TFIID de l'ARN polymérase 2. Il a été ainsi montré *in vivo* que la perte de la H3K4me3 sur certains gènes entraîne une diminution du recrutement de TFIID au niveau de leur promoteur, ce qui se traduit par une baisse de la transcription (Vermeulen *et al*, 2007). H3K4me3 est également reconnu par le complexe de remodelage de la chromatine CHD1 qui favorise l'élongation de la transcription en participant au désassemblage des nucléosomes dans la région promotrice de gènes. (Ehrensberger & Kornberg, 2011). H3K4me3 favorise également la transcription en empêchant le recrutement de répresseurs transcriptionnels comme le complexe NuRD qui possède une activité de remodelage de la chromatine et une activité histone déacétylase (Nishioka *et al*, 2002; Zegerman *et al*, 2002) ou encore le facteur DNMT3L impliqué dans la méthylation de l'ADN (Ooi *et al*, 2007).

A la lumière de ces données, la triméthylation de H3K4 est largement associée à l'activation de la transcription. Cependant, de façon intéressante, Il a également été montré qu'en cas de dommage à l'ADN, la triméthylation de H3K4 recrute le complexe répresseur mSIN3A/HDAC1 qui va réprimer la transcription au niveau de gènes actifs. Dans ce dernier cas H3K4me3 sert de marqueur de gènes actifs qui va conduire à réprimer ceux-ci dans un contexte défavorable (Shi *et al*, 2006). Cette observation souligne le fait qu'il est difficile d'associer systématiquement une modification d'histone à l'activation ou la répression de la transcription, l'impact de la marque pouvant être modulé par le contexte cellulaire.

La diméthylation de H3K4 est retrouvée sur les gènes actifs, un peu en aval de la triméthylation H3K4me3 et dans le début de la région codante. De ce fait il est admis que cette modification favorise la transcription (Barski *et al*, 2007). Mais cette hypothèse est remise en cause par les travaux chez la levure qui montrent que la déplétion de l'enzyme responsable de la méthylation de H3K4 se traduit par l'augmentation de l'acétylation (marque activatrice) dans les régions normalement méthylées sur H3K4me2. Cette étude montre que H3K4me2 recrute le complexe histone déacétylase set3C (pour set3 Complex) dont la sous unité set3 possède un domaine PHD capable de lier H3K4me2. Ces données soutiennent le modèle selon lequel H3K4me2 servirait à limiter l'acétylation des histones, en dehors de la région promotrice afin de limiter l'initiation cryptique de la transcription. La découverte

récente des histones déméthylases spécifiques de H3K4me3 ouvre également la possibilité d'un modèle non contradictoire avec le précédent selon lequel, suite au passage de l'ARN polymérase, H3K4me3 pourrait être déméthylée en H3K4me2 qui recruterait des histones déacétylases pour refermer la chromatine (Buratowski, 2009; Buratowski & Kim, 2010).

La monométhylation de H3K4 (H3K4me1) a longtemps été considérée comme une marque spécifique des enhancers du fait de son fort enrichissement dans ces régions où elle est mise en place par le complexe histone méthyltransférase MLL3/4 (Barski *et al*, 2007; Outchkourov *et al*, 2013). Une étude récente montre que les KMTs MLL3/4 établissent H3K4me1 au promoteur de certains gènes musculaires lorsque ceux-ci sont réprimés dans les myoblastes. L'activation de ces gènes lors de la myogénèse se traduit par une diminution de H3K4me1 au profit de H3K4me3. Cette étude montre également que la présence de H3K4me1 dans la région codante de gènes actifs sert à y empêcher le recrutement de facteurs normalement recrutés par H3K4me3 tels que ING1 et mSIN3A et qui doivent être restreints à la région promotrice (Cheng *et al*, 2014).

#### Méthylation sur H3K36:

La tri-méthylation sur H3K36 est une autre marque majeure associée aux gènes actifs (Barski *et al*, 2007). Le rôle de H3K36me3 dans la transcription est conservé de la levure à l'homme (Wagner & Carpenter, 2012). On retrouve H3K36 me3 dans la région codante des gènes actifs. Les travaux chez la levure ont permis de montrer que l'histone méthyltransférase Set2 est recrutée par l'ARN polymérase II en cours d'élongation pour tri- et di-méthyliser H3K36 dans la région codante des gènes transcrits. H3K36me3 et H3K36me2 permettront ensuite le recrutement du complexe histone déacétylase Rpd3S *via* sa sous unité à chromodomaine Eaf3 et le domaine PHD de Rpd3S. Le complexe Rpd3S permet la recompaction de la chromatine après le passage de l'ARN polymérase et ainsi éviter l'initiation aberrante de transcription dans la région codante (Carrozza *et al*, 2005; Keogh *et al*, 2005). Des données suggèrent que ce mécanisme serait conservé chez l'Homme. En effet, on retrouve également H3K36me3 dans la région codante des gènes actifs chez l'humain (Barski *et al*, 2007). La protéine SET2 humaine est également recrutée par l'ARN Pol II. De plus, le complexe histone déacétylase MRG15 chez l'humain interagit avec H3K36me3 (Wagner & Carpenter, 2012). Il a été montré que le complexe MRG15 qui contient notamment l'histone déméthylase JARID1A/KDM5A est recruté dans la région

codante de gènes actifs et limite l'initiation cryptique de la transcription en déméthylant H3K4 (Hayakawa *et al*, 2007) .

Si le rôle de la triméthylation de H3K36me3 dans l'élongation de la transcription a été caractérisé, très peu de choses ont été décrites à ce jour sur la mono et la diméthylation de H3K36.

### Méthylation sur H3K79

La méthylation de H3K79 est mise en place par l'histone méthyltransférase DOT1. En effet la déplétion des homologues de Dot1/DOT1L chez la levure, la drosophile ou chez la souris se traduit par une perte totale de la méthylation sur H3K79 (Jones *et al*, 2008; Shanower *et al*, 2005; van Leeuwen *et al*, 2002). Les analyses à l'échelle du génome montrent que les trois niveaux de méthylation sur H3K79 marquent le corps des gènes actifs, suggérant un rôle dans l'élongation de la transcription (Schubeler *et al*, 2004). Il a été montré que l'activité méthyltransférase de DOT1L était positivement régulée par la protéine PAF3 qui interagit avec l'ARN polymérase en cours d'élongation. De plus, des études protéomiques montrent que DOT1 se retrouve en complexe avec les protéines ENL (Eleven Nineteen Leukemia) et p-TEFb (positive Transcriptional Elongation Factor), impliquées toutes les deux dans l'élongation de la transcription. p-TEFb/CDK-9 est une CDK (kinase dépendante des cyclines) impliquée dans la phosphorylation de la sérine 2 du CTD de l'ARN Pol-II, phosphorylation requise pour la transition entre initiation et élongation de la transcription. ENL interagit avec le CTD de l'ARN polymérase. Il a été montré que la déplétion de ENL entraîne une diminution de la diméthylation sur H3K79 qui s'accompagne d'une baisse globale des niveaux d'élongation de la transcription mesurés par run-on (Mueller *et al*, 2007).

Le rôle de la méthylation de H3K79 dans la régulation de la transcription est appuyé par des études fonctionnelles *in- vivo* chez la souris (Nguyen *et al*, 2011) et dans les cellules de carcinome embryonnaire humain NCCIT (Kim *et al*, 2012) qui montrent que la méthylation de DOT 1 s'accompagne de la répression transcriptionnelle et de l'augmentation de H3K79 sur des gènes cibles.

## ii. Les Marques associées aux gènes réprimés :

### a-Méthylation sur H3K9

On retrouve la tri- et la di-méthylation de H3K9 au promoteur des gènes réprimés et dans les régions de l'hétérochromatine constitutive comme facultative (Black *et al*, 2012). Ces marques sont reconnues par les protéines HP1 (hétérochromatin protein 1) *via* leur chromodomaine. Les protéines HP1 sont capables de dimériser *via* leur domaine CSD (Chromo Shadow Domain). Elles vont ainsi réprimer le gène en y établissant l'hétérochromatine, structure compacte et réfractaire à la transcription (Kouzarides, 2007). De nombreuses études ont établi le rôle de H3K9me3 et H3K9me2 dans la répression transcriptionnelle (Bannister & Kouzarides, 2011; Black *et al*, 2012). Par exemple la triméthylation de H3K9 par l'histone méthyltransférase Suv39H a été impliquée dans la répression transcriptionnelles des gènes cibles de E2F lors de la différenciation musculaire (Ait-Si-Ali *et al*, 2004). SUV39H a également été impliquée dans la répression des gènes ribosomiques (Murayama *et al*, 2008). Ainsi il est largement admis que H3K9me3 et H3K9me2 sont des marques de la répression transcriptionnelle. Cependant, des études suggèrent un rôle de ces marques dans l'activation de la transcription. En effet on retrouve H3K9me2 et H3K9me3 dans la région codante de gènes actifs (Vakoc *et al*, 2005; Yuan *et al*, 2007; Zentner *et al*, 2011). Cette présence corrèle avec le recrutement du variant HP1 $\gamma$  et est dépendante de l'activité transcriptionnelle. Toutefois les mécanismes par lesquels H3K9me2/3 et HP1 $\gamma$  participent à l'activation transcriptionnelle restent à élucider. Kwon et collaborateurs montrent que le recrutement par HP1 $\gamma$  de l'histone chaperonne FACT, impliquée dans la mise en place et l'enlèvement des nucléosomes est requis pour l'activation transcriptionnelle de gènes impliqués dans la réponse au choc thermique (Kwon *et al*, 2010b).

### b- La méthylation sur H3K27

La tri-méthylation de H3K27 a été impliquée dans la répression par le complexe Polycomb des gènes homéotiques impliqués dans le lignage cellulaire. H3K27 est triméthylée par le complexe PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2) *via* ses sous unités à domaine Set, EZH1 et EZH2. H3K27me3 sert ensuite de point d'ancrage pour le recrutement du complexe PRC1 (Polycomb Repressive Complex 1) *via* différentes sous unités à chromodomaines. Le recrutement de PRC1 entraîne l'ubiquitinylation de H2A K119 et la

compaction de la chromatine (Di Croce & Helin, 2013; Morey & Helin, 2010). Il a été montré que l'activité ubiquitine ligase du complexe PRC1 est requise pour la répression transcriptionnelle (Di Croce & Helin, 2013). Le rôle de H2AK119-Ub dans la répression transcriptionnelle a été développé dans la rubrique ubiquitinylation des histones.

Peu de choses sont connues sur la mono et la diméthylation de H3K27. Toutefois, une étude récente a montré que H3K27me3, H3K27me2 et H3K27me1 occupent des régions bien distinctes du génome et que la mise en place de H3K27me1 dans la région codante de gènes actifs par PRC2 est requise pour leur activation transcriptionnelle, tandis que H3K27me2 permet la répression à certains enhancers en empêchant l'acétylation sur H3K27 (Ferrari *et al*, 2014).

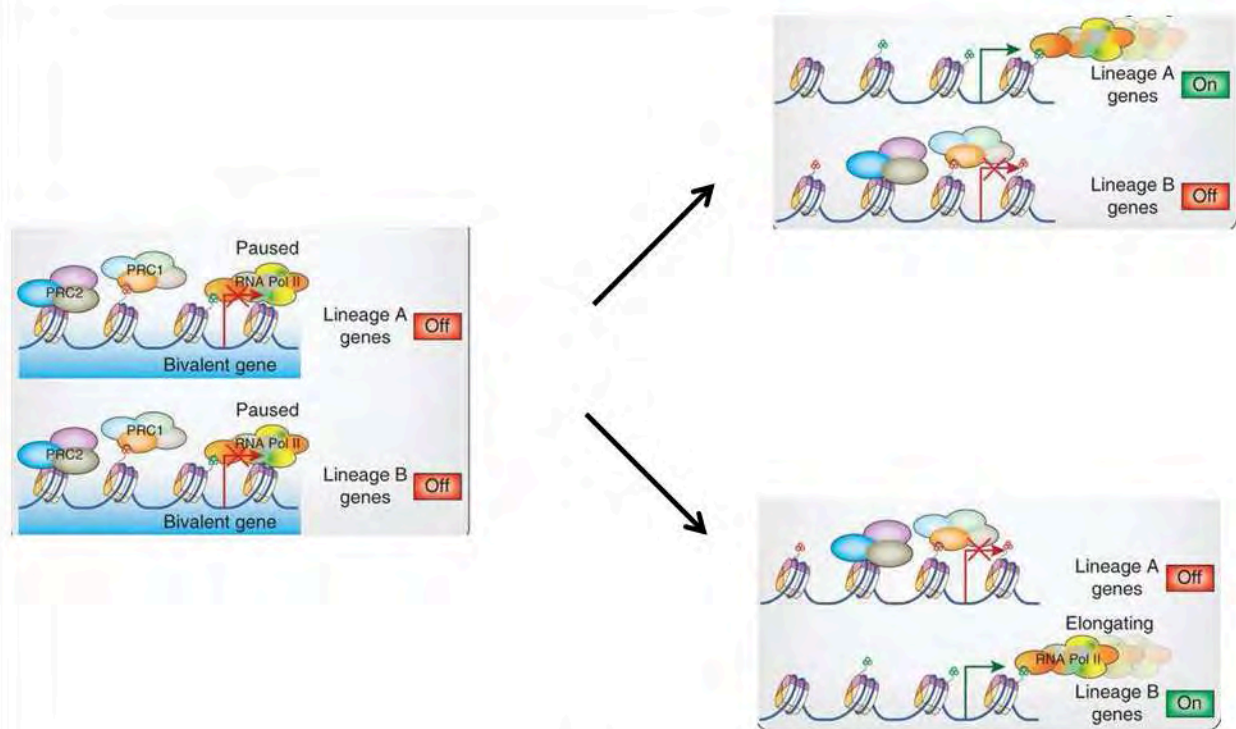
#### c-La méthylation sur H4K20

La triméthylation sur H4K20 est associée à l'hétérochromatine et à la répression transcriptionnelle. La diminution du niveau de H4K20me3 au promoteur de certains gènes a été corrélée avec leur activation transcriptionnelle (Kwon *et al*, 2010a). De plus l'inhibition ou la déplétion chez la souris de Suv4-20H, KMT spécifique de H4K20 entraîne une dérépression de la transcription sur de nombreux gènes (Miranda *et al*, 2009; Schotta *et al*, 2008).

La monométhylation de H4K20 a été associée à l'activation de la transcription dans différents modèles cellulaires. Cependant d'autres études montrent que la méthylation sur H4K20 est associée à des régions transcriptionnellement réprimées (Karachentsev *et al*, 2005). En effet H4K20me1 peut être reconnue par la protéine L3MBT, impliquée dans la répression transcriptionnelle (Kalakonda *et al*, 2008).

Peu d'études à ce jour ont fait un lien entre la diméthylation sur H4K20 et la régulation transcriptionnelle.





**Figure 10: Régulation transcriptionnelle des gènes bivalents par les complexes Polycomb dans les cellules souches**

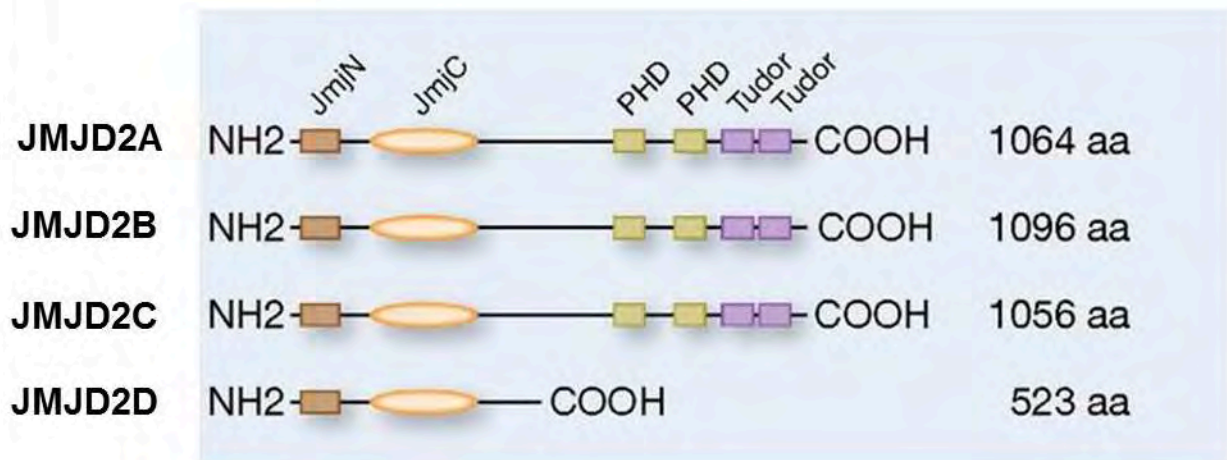
Dans les cellules souches, les gènes correspondants aux lignages A et B sont en pause. La pause est caractérisée par la présence d'une part, des complexes répresseurs Polycomb (PRC1 et PRC2) recrutés via H3K27 me3 et d'autre part, de l'ARN Pol-II recrutée via H3K4 me3. Lors du choix du lignage A, les gènes correspondants à ce lignage seront activés (Déméthylation de H3K27me3) tandis que les gènes correspondants au lignage B seront réprimés de façon stable (déméthylation de H3K4me3). Inversement pour le choix du lignage B. Les histones déméthylases UTX (H3K27 spécifique) et JARID1A (H3K4 spécifique) ont été impliquées respectivement dans l'activation et la répression des gènes bivalents dans les cellules souches embryonnaires.

*Adapté de Di Croce and helin 2012*

#### d- Les promoteurs bivalents :

Certains promoteurs dits bivalents présentent à la fois la marque H3K4me3 associée à l'activation transcriptionnelle et H3K27me3 associée à la répression. Les gènes bivalents sont dans un état dit en pause caractérisé par la présence concomitante de l'ARN polymérase et du complexe répresseur Polycomb (Di Croce & Helin, 2013; Morey & Helin, 2010). Ils peuvent donc être rapidement activés ou réprimés de manière stable en réponse à un stimulus. Ce marquage bivalent est retrouvé principalement au niveau des gènes de détermination des lignages cellulaires ou de la différenciation, au cours du développement précoce ou dans les cellules souches chez l'adulte (Di Croce & Helin, 2013). Ainsi, au cours de la différenciation, les gènes correspondant au lignage voulu seront activés (déméthylation de H3K27me3) tandis que ceux des autres lignages seront réprimés (déméthylation de H3K4me3)(Bernstein *et al*, 2006) (**figure 10**). L'histone déméthylase KDM5A/JARID1A a été impliquée dans la déméthylation de H3K4me3 sur les gènes bivalents et leur répression (Pasini *et al*, 2008). L'histone déméthylase UTX spécifique de H3K27me3 a été impliquée dans leur activation (Seenundun *et al*, 2010).

Les promoteurs bivalents ne concernent pas que les gènes impliqués dans le développement. En effet, Xie et collaborateurs ont mis en évidence la présence de copies à marques bivalentes au niveau des gènes ribosomiques (Xie *et al*, 2012).



**Figure 11: Structure des KDM4/JMJD2**

Les KDM4 possèdent dans leur région N-terminale les domaines JmjN et JmjC qui portent l'activité catalytique. KDM4A-C possèdent en plus deux domaines PHD et un double domaine Tudor. Ces domaines sont capables d'interagir avec d'autres protéines mais également avec des résidus méthylés.

Adapté de Berry *et al.* 2013

## b) Les familles JMJD2/KDM4 et JARID1/KDM5 dans la régulation transcriptionnelle

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé, d'une part, au rôle de l'histone déméthylase KDM4/JMJD2A dans la régulation des gènes ribosomiques, et d'autre part, à l'implication de KDM5A/JARID1A et KDM5B/JARID1B dans la régulation transcriptionnelle des gènes cibles de E2F (Voir rubrique objectifs de la thèse). JMJD2A et JARID1A/B appartiennent respectivement aux familles des KDM4/JMJD2 et KDM5/JARID1. Dans cette rubrique je présente les protéines de ces deux familles d'histones déméthylases en mettant l'accent sur leur implication dans la régulation transcriptionnelle.

### i. Famille des KDM4/JMJD2

La famille des KDM4, ou JMJD2 (Jumonji Domain 2) ou encore JHDM3 comporte 4 membres, JMJD2A à D. JMJD2A, B et C sont spécifiques des résidus H3K9 et H3K36 di et tri-méthylé. JMJD2D ne déméthyle pas H3K36. Les JMJD2 peuvent également déméthyliser les formes triméthylées de la lysine 26 de l'isotype H1.4 de l'histone linker H1 (H1.4K26me3). Cette marque et sa fonction sont moins bien caractérisées (Trojer *et al*, 2009). Les JMJD2 possèdent dans leur région N-terminale les domaines JmjC et JmjN qui portent l'activité catalytique. JMJD2A-C possèdent en plus deux domaines PHD et deux domaines TUDOR capables d'interagir avec d'autres protéines ou avec des résidus méthylés. Par exemple, le double domaine TUDOR de JMJD2A reconnaît H3K4me3 et H3K20me2 (Berry & Janknecht, 2013). (**figure 11**)

### KDM4A/JMJD2A :

JMJD2A a été impliquée dans la régulation de la transcription. Aussi bien dans l'activation que dans la répression.

En accord avec son activité déméthylase contre la marque répressive H3K9, plusieurs études ont montré que JMJD2A peut participer à l'activation de la transcription. Elle a ainsi été impliquée dans l'activation transcriptionnelle en coopération avec les récepteurs aux oestrogènes et aux androgènes. Dans ces cas l'activation transcriptionnelle des gènes cibles est dépendante de l'activité déméthylase de JMJD2A et s'accompagne de la déméthylation de H3K9 au promoteur des gènes cibles (Berry *et al*, 2012; Shin & Janknecht, 2007). JMJD2A a ainsi été décrite comme un effecteur régulé pour permettre la transcription de gènes. En effet, Le niveau de JMJD2A est régulé par différentes ubiquitine ligases dont RNF8, capables d'induire sa dégradation par le protéasome (Mallette *et al*, 2012). Dans les adipocytes, le facteur de transcription GPS2 (G Protein Suppressor 2) est requis pour activer des gènes comme *ATGL* (Adipose triglycéride lipase) ou *HSL* (Hormone Sensitive lipase). Pour activer ces gènes cibles GPS2 inhibe la dégradation de JMJD2A par RNF8. Ceci se traduit par une augmentation du niveau de JMJD2A qui conduit à la déméthylation de H3K9 au promoteur des gènes cibles (Cardamone *et al*, 2014). JMJD2A peut également agir comme plateforme de recrutement pour d'autres protéines. Par exemple, Mon équipe d'accueil a montré qu'une petite isoforme de JMJD2A ( $\Delta$ N-JMJD2A) est requise pour l'activation transcriptionnelle de la myogénine au cours de la différenciation musculaire. La différenciation des myoblastes en myotubes requiert l'activation transcriptionnelle de la myogénine, gène clé du programme de différenciation musculaire.  $\Delta$ N-JMJD2A est dépourvue d'activité catalytique, ce qui indique qu'elle participe au recrutement d'une autre histone déméthylase qui déméthyle H3K9me3. De façon intéressante, la déplétion de JMJD2C reproduit les effets de celle de JMJD2A et  $\Delta$ N-JMJD2A sur la différenciation musculaire et  $\Delta$ N-JMJD2A interagit avec JMJD2C, suggérant que JMJD2C soit recrutée par  $\Delta$ N-JMJD2A au niveau du promoteur de la myogénine pour déméthyliser H3K9me3 (Verrier *et al*, 2011a).

Avant l'identification de son activité déméthylase, JMJD2A était connue comme un co-répresseur transcriptionnel. Ainsi, avec la protéine du rétinoblastome (Rb) et l'histone déacétylase HDAC2, elle a été impliquée, par des tests de transactivation, dans la répression transcriptionnelle de gènes cibles de E2F (Gray *et al*, 2005). Elle est recrutée avec le complexe répresseur N-Cor et participe à la répression du gène *ASCL2* (Klose *et al*, 2006;

Zhang *et al*, 2005). Plus récemment il a été montré qu'elle inhibe la sénescence induite par l'oncogène Ras. Son action dans ce processus passe par la répression transcriptionnelle du suppresseur de tumeur CHD5 (Mallette & Richard, 2012). Si elle interagit avec des co-répresseurs, les mécanismes moléculaires précis par lesquels JMJD2A réprime la transcription sont encore mal compris.

En effet, l'action répressive de JMJD2A est contre-intuitive au regard de son activité dirigée contre H3K9me3. Cependant, dans la dernière étude, Mallette et collaborateurs n'observent pas de recrutement de JMJD2A dans la région promotrice (à -100 pb) mais un peu plus en aval (+750 pb). On est en mesure de se demander si JMJD2A réprime la transcription en ciblant H3K9 et H3K36 dans la région codante des gènes. En effet, comme décrit dans la rubrique méthylation des histones et transcription, des données suggèrent que dans la région codante des gènes, la méthylation sur H3K9me3/2 est associée à l'activation de la transcription. De même, la méthylation sur H3K36 dans la région codante des gènes permet de limiter l'initiation cryptique de la transcription, qui pourrait conduire à la formation d'antisens et la répression transcriptionnelle. JMJD2A en déméthylant H3K36 dans la région codante de CHD5, pourrait le rendre plus sensible à l'initiation cryptique de la transcription. JMJD2A est en effet capable de déméthyliser H3K36me3. Une étude chez la drosophile montre que l'homologue HP1a de HP $\alpha$  interagit avec l'orthologue dKDM4A de JMJD2A chez la drosophile. HP1a recrute dKDM4A et stimule sa capacité à déméthyliser H3K36me3 (Lin *et al*, 2008). La déplétion de HP1a conduit à l'augmentation des niveaux de H3K36me3 dans des régions aussi bien de l'hétérochromatine que de l'euchromatine. Une autre possibilité serait qu'elle régule négativement via la déméthylation, une protéine non histone impliquée dans la régulation de la transcription sur ce gène mais cette hypothèse n'a pas été testée.

Une étude très récente a impliqué JMJD2A dans la régulation de la traduction. JMJD2A est présente dans le cytoplasme des cellules humaines cancéreuses HEK293T. Elle interagit avec plusieurs protéines de la machinerie de traduction. Sa déplétion entraîne une diminution globale de la synthèse protéique, et augmente les effets de l'inhibition de mTOR sur la synthèse protéique (Van Rechem *et al*, 2015). Le mode d'action de JMJD2A dans ce processus reste à déterminer.

## KDM4B

JMJD2B a été principalement décrite comme un activateur transcriptionnel. Elle a été impliquée dans la prolifération des cellules du cancer du sein ER-positives (Kawazu *et al*, 2011; Shi *et al*, 2011). En effet, sa déplétion inhibe la prolifération des cellules de cancer du sein ER-Positives MCF-7. En accord avec ces données, il a été montré que JMJD2B participe à l'activation transcriptionnelle de gènes cibles du récepteur aux oestrogènes. Dans ce processus, JMJD2B en collaboration avec la H3K4 KMT MLL permet de coupler la déméthylation sur H3K9 et la méthylation de H3K4 au promoteur des gènes cibles (Shi *et al*, 2011). JMJD2B régule également les gènes cibles de  $\beta$ -Catenine ; *JUN*, *Myc* et *CcnD1*. JMJD2B interagit avec le complexe  $\beta$ -Catenine/TCF4 qui la recrute au promoteur des gènes cibles. La déplétion de JMJD2B conduit à la répression transcriptionnelle des gènes cibles (Berry *et al*, 2014). JMJD2B a été montrée récemment comme étant requise pour l'activation transcriptionnelle de la myogénine lors de la différenciation musculaire dans les cellules C2C12. Cette étude ne montre pas si l'activité déméthylase de JMJD2B est requise dans ce processus.

## KDM4C

JMJD2C est également connue sous le nom de GASC1 (Gene Amplified in squamous Cancer). Elle a été impliquée *via* sa capacité à démétyler H3K9me3/me2 dans l'activation transcriptionnelle. En coopération avec LSD1/KDM1, elle participe à l'activation transcriptionnelle des gènes cibles du récepteur des androgènes (Wissmann *et al*, 2007). Dans les cellules embryonnaires elle participe au maintien de l'auto-renouvellement *via* l'activation transcriptionnelle de Nanog. Sa déplétion entraîne une augmentation de H3K9me3/me2 qui s'accompagne du recrutement de HP1 et du co-represseur KAP1 au promoteur de Nanog (Loh *et al*, 2007).

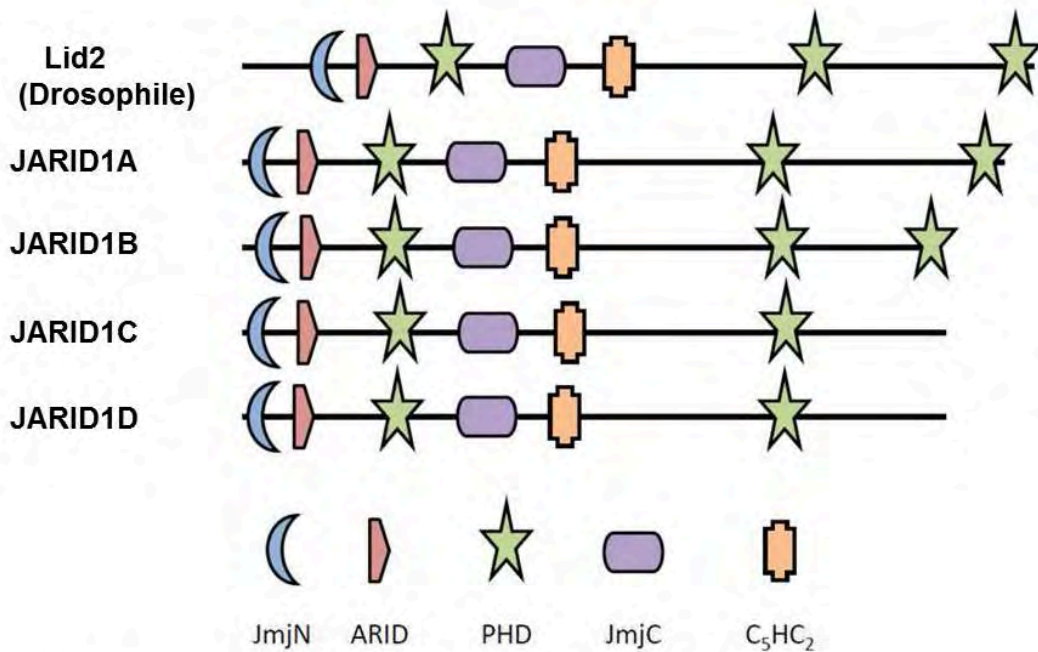
Comme JMJD2A, JMJD2C a également été impliquée dans la répression transcriptionnelle. Là aussi, son rôle dans la répression transcriptionnelle s'accompagne de l'interaction avec des co-répresseurs. En effet, son action dans la répression transcriptionnelle de PPAR $\gamma$ , gène clé de la différenciation des adipocytes, est dépendante de son domaine TUDOR et de HDAC1 (Lizcano *et al*, 2011). Dans les cellules embryonnaires, elle coopère

avec le complexe PRC2 dans la répression de gènes développementaux bivalents comme *Klf4*, et *Tbx3* (Das *et al*, 2014).

### KDM4D

JMJD2D est le membre le moins étudié de la famille JMJD2. Elle diffère des autres membres par sa capacité à démétyler seulement H3K9me3/2 mais pas H3K36me2/3 (Berry & Janknecht, 2013). JMJD2D via son activité déméthylase coopère avec p53 dans l'activation transcriptionnelle de p21. L'activité déméthylase de JMJD2D est requise dans ce processus, suggérant qu'elle pourrait agir en déméthylant H3K9 au promoteur de p21 (Berry *et al*, 2014). Zhu et collaborateurs ont montré que la tri-méthylation de H3K9me3 au niveau de séquences enhancers permet la répression de gènes spécifiques de tissu. Par exemple, les gènes *Mdc* et *Il12b* spécifiques des cellules immunitaires sont actifs dans les macrophages et les cellules dendritiques. JMD2D est recrutée aux enhancers de ces gènes et permet leur activation transcriptionnelle en y déméthylant H3K9me3 (Zhu *et al*, 2012).





**Figure 12: structure des KDM5/JARID1**

Les KDM5 sont caractérisées par la présence d'un domaine ARID (A/T Rich Interacting Domain) capable de lier l'ADN. Elles possèdent également plusieurs domaines PHD capables de lier des résidus méthylés notamment H3K4me3 et H3K9me3 ainsi qu'un domaine à doigt de zinc C<sub>5</sub>HC<sub>2</sub>. L'activité catalytique est portée par les domaines JmjC et JmjN. Cette structure est conservée entre la protéine Lid2/JARID1/KDM5, seul membre de la famille JARID1 chez la drosophile et les KDM5 humaines.

Adapté de Blair *et al.* 2011

## ii. Famille des KDM5/JARID1

La famille des KDM5 inclut 4 membres A à D chez les mammifères. KDM5A et B sont les plus étudiés. Cette rubrique présente les KDM5 et leur implication dans la régulation de la transcription, qui est de loin le principal processus dans lequel elles ont été impliquées.

Les KDM5 ou JARID1 (pour Jumonji AT-Rich Interacting Domain) sont des histone-déméthylases capables de déméthyliser les formes di- et tri-méthylées de H3K4. Chez la drosophile et la levure il existe une seule KDM5 plus connue sous le nom de Lid2. Les KDM5 chez les eucaryotes supérieurs sont caractérisées par la présence d'un domaine ARID (A/T Rich Interacting Domain) capable de lier l'ADN. Elles possèdent également plusieurs domaines PHD capables de lier des résidus méthylés notamment H3K4me3 et H3K9me3 ainsi qu'un domaine à doigt de zinc C5HC2. L'activité catalytique est portée par les domaines JmjC et JmjN. Cette structure est conservée de la drosophile à l'homme. (Blair *et al*, 2011)(**Figure 12**).

### KDM5A :

En accord avec son activité déméthylase qui enlève les marques activatrices H3K4me3/2, JARID1A a été largement impliquée dans la répression transcriptionnelle. Des études chez les mammifères et la levure l'ont impliqué dans les mécanismes qui couplent la déméthylation de H3K4 à la méthylation de H3K9 (Chaturvedi *et al*, 2012; Li *et al*, 2008). JARID1A peut également agir comme un activateur transcriptionnel, potentiellement en servant de plateforme de recrutement pour d'autres activités de modification de la chromatine (Secombe *et al*, 2007). Elle fait partie de complexes protéiques contenant d'autres régulateurs chromatiniques avec lesquels elle coopère.

Initialement connue sous le nom de RBP2 (Retinoblastoma binding protein 2), JARID1A est capable d'interagir avec Rb. En coopération avec Rb, elle a été impliquée dans la répression transcriptionnelle, notamment lors du processus de sénescence. La sénescence est présentée comme un mécanisme de défense anti-tumorale qui entraîne une sortie irréversible du cycle cellulaire. La sénescence peut être induite en réponse à l'activation d'oncogènes comme Ras (Chicas *et al*, 2012; Chicas *et al*, 2010). Au cours de la sénescence induite en surexprimant Ras, les gènes cibles de E2F, qui sont impliqués dans la progression

dans le cycle cellulaire sont réprimés de façon Rb dépendante. Rb interagit avec JARID1A (et JARID1B). Leur déplétion combinée (JARID1A et JARID1B) se traduit par une dérégulation de gènes cibles de E2F. Cette dérégulation s'accompagne de l'augmentation des niveaux de H3K4me3 au TSS des gènes cibles de E2F et entraîne une inhibition de l'arrêt du cycle cellulaire en réponse à l'oncogène Ras (Chicas *et al*, 2012). La relation entre la protéine du rétinoblastome (Rb) et JARID1A est complexe. En effet, chez les mammifères Rb peut se comporter comme un activateur transcriptionnel des gènes de la différenciation des cellules osseuses comme l'ostéocalcine ou la phosphatase alcaline, ce, en entraînant la délocalisation de JARID1A du promoteur cible et une augmentation du niveau de H3K4me3 (Benevolenskaya *et al*, 2005; Flowers *et al*, 2010; Gutierrez *et al*, 2005). Au cours de la différenciation cellulaire également, les gènes impliqués dans la progression dans le cycle sont réprimés. Le facteur de transcription E2F4 a été impliqué dans cette répression. Van Oevelen et collaborateurs ont observé au cours de la différenciation musculaire que JARID1A est recrutée avec E2F4 au promoteur de gènes du cycle cellulaire. La répression de ces gènes corrèle avec le recrutement de JARID1A et la déméthylation de H3K4me3 à leur TSS (van Oevelen *et al*, 2008). Plus tard il a été montré par une étude fonctionnelle au cours de la différenciation des cellules ES de souris, que JARID1A participe à la répression des gènes cibles de E2F4 et déméthyle H3K4me3 à leur promoteur (Beshiri *et al*, 2012).

La répression transcriptionnelle par JARID1A ne se limite pas aux gènes du cycle cellulaire ou de la différenciation ostéogénique. Par exemple, JARID1A fait partie du complexe répresseur Notch-RBP-J et a été impliquée dans la répression des gènes cibles de la voie NOTCH *via* la déméthylation de H3K4me3 (Liefke *et al*, 2010). JARID1A est également recrutée par le complexe répresseur Polycomb PRC2 sur les gènes bivalents (gènes régulateurs du développement) dans les cellules souches embryonnaire de souris où elle permet la déméthylation de H3K4me3 (Pasini *et al*, 2008) (cf rubrique gènes bivalents).

Les méthylations sur H3K9 et H3K4, en accord avec leur action antagoniste sur la transcription, sont deux marques mutuellement exclusives (Verrier *et al*, 2011b). Ceci implique qu'il existe des mécanismes qui permettent de coupler la mise en place de l'une à l'enlèvement de l'autre. Ces mécanismes sont encore à l'étude. Lid2 chez la levure, puis JARID1A chez les mammifères ont été impliquées dans ces processus. Li et collaborateurs

ont montré que Lid2 participe au couplage de la méthylation de H3K4me3 avec la déméthylation de H3K9me. Lid2 permet le recrutement de la H3K4 méthyltransférase Set1 et de la H3K9me2 déméthylase Lsd1. Dans ce contexte, Lid2 joue seulement un rôle de plateforme de recrutement, la présence de ses partenaires inhibe son activité de déméthylation de H3K4me3 (Li *et al*, 2008). Chez la souris, dans les cellules érythroïdes, JARID1A a été impliquée dans le couplage entre la déméthylation de H3K4me3 et la méthylation de H3K9me2 par G9A. Le promoteur de l'*E<sup>γ</sup>-globine* (globin embryonnaire) est réprimé et caractérisé par la présence de la marque répressive H3K9me2 et l'absence de H3K4me3. L'histone méthyltransférase G9a spécifique de H3K9 interagit avec JARID1A. G9a est recrutée sur le promoteur de l'*E<sup>γ</sup>-globin* et permet le recrutement de JARID1A. La déplétion de G9a entraîne la perte du recrutement de JARID1A et s'accompagne de l'augmentation de H3K4me3, de la diminution de H3K9me2 et de la dérégulation transcriptionnelle de l'*E<sup>γ</sup>-globine* (Chaturvedi *et al*, 2012).

Une étude chez la *Drosophile* montre que Lid2 (l'orthologue de JARID1A et JARID1B) interagit avec l'oncogène dMyc et est requise pour l'activation transcriptionnelle de *Nop60B*, gène cible de dMyc. Dans ce contexte l'interaction avec dMyc inhibe l'activité déméthylase de Lid2. Les auteurs proposent que Lid2 est requise pour le recrutement de dMyc (Secombe *et al*, 2007). Chez les mammifères, il a été montré que JARID1A coopère avec Rb dans l'activation transcriptionnelle de gènes comme *BRD2* et *BRD8* (Benevolenskaya *et al*, 2005). Les mécanismes moléculaires impliqués dans ces processus ne sont pas connus.

JARID1A coopère également avec d'autres activités régulant la chromatine, notamment des histone-déacétylases et des complexes de remodelage de la chromatine. Elle fait notamment partie des complexes répresseurs histone-déacétylases Sin3B et MRG15, et du complexe répresseur NuRD (qui possède une activité de remodelage de la chromatine et de déacétylation des histones). Au cours de la différenciation musculaire, JARID1A interagit avec le complexe répresseur histone déacétylase Sin3B également impliqué dans la répression des gènes cibles de E2F (van Oevelen *et al*, 2008). JARID1A coopère avec le complexe NuRD dans la déméthylation de H3K4me3 et H3K4me2 au promoteur de gènes comme *GDF15*, *KLF2*, *HES7*, et *PDGF7*. La déplétion de JARID1A ou de la sous-unité catalytique CHD4 du complexe NuRD conduit à l'augmentation de H3K4me3 et H3K4me2 au TSS de ces gènes (Nishibuchi *et al*, 2014). Au sein d'un complexe MRG15, JARID1A a été impliquée dans la déméthylation de H3K4me3 dans la région codante des gènes actifs. En effet, du fait de sa capacité à recruter l'ARN-Polymérase, H3K4me3 doit être déméthylée

dans la région codante des gènes pour éviter une initiation cryptique de la transcription. L'initiation cryptique de la transcription peut générer par exemple des ARN antisens qui vont conduire à la dégradation de l'ARN messager. Chez la levure la triméthylation sur H3K36 a été impliquée dans la répression de l'initiation cryptique de la transcription (Wagner & Carpenter, 2012). Il a été montré dans des cellules humaines (HeLa) que JARID1A fait partie du complexe histone-déacétylase MRG15 qui possède un chromodomaine capable de lier H3K36me3. JARID1A est recrutée dans la région codante des gènes actifs *RPL11a* et *GAPDH* et sa déplétion s'accompagne de l'augmentation de H3K4me3 dans leur région codante (Hayakawa *et al*, 2007).

### KDM5B/JARID1B

KDM5B/JARID1B/PLU-I a largement été décrite comme un répresseur transcriptionnel. KDM5B est capable de déméthyliser les formes mono, di et tri-méthylées de H3K4. Elle a été impliquée en tant que régulateur transcriptionnel dans différents processus cellulaires. Ces processus incluent le maintien de l'auto-renouvellement des cellules souches *via* la répression des gènes de la différenciation (Xie *et al*, 2011), le développement embryonnaire *via* la régulation de gènes développementaux (Albert *et al*, 2013), la prolifération des cellules cancéreuses en réprimant des suppresseurs de tumeurs comme P21 (Wong *et al*, 2012), ou encore la sénescence où elle intervient dans la répression des gènes cibles de E2F (Chicas *et al*, 2012). Ces études montrent qu'elle participe à la répression transcriptionnelle en déméthylant la marque activatrice H3K4me3 dans la région promotrice de ses gènes cibles. De ce fait, elle est un effecteur de facteurs de transcription qui vont soit réprimer la transcription *via* son recrutement, soit au contraire activer la transcription en entraînant son éviction du promoteur. Par exemple, l'activation transcriptionnelle sur certains promoteurs cibles du facteur de transcription FOXP3 s'accompagne de l'éviction de JARID1B et l'augmentation du niveau de H3K4me3 au promoteur (Katoh *et al*, 2011).

JARID1B, interagit également avec le complexe répresseur LSD1/NuRD. LSD1/KDM1A est une histone déméthylase capable de déméthyliser H3K4me2 et H3K4me1. JARID1B permet de recruter LSD1 sur des nucléosomes tri-méthylés sur H3K4 et coopère avec LSD1 pour déméthyliser H3K4me3 et H3K4me2. Le complexe JARID1B/LSD1/NuRD est recruté sur le promoteur du gène de la chimiokine CCL4, impliquée dans l'angiogenèse, et réprime la transcription de CCL4 en déméthylant H3K4me3 et H3K4me2. Cette répression

s'accompagne d'une diminution du potentiel angiogénique de cellules du cancer du sein (Li *et al*, 2011b). Comme décrit dans le paragraphe précédent, JARID1A interagit également avec le complexe NuRD. Cependant aucun lien n'a été fait entre ces deux études. Les complexes de remodelage comme NuRD existent sous la forme de différents sous types. Il serait intéressant de savoir si JARID1A et JARID1B sont présentes ensemble ou séparément dans le complexe NuRD.

L'interaction avec NuRD, n'est pas le seul processus dans lequel JARID1A et JARID1B ont toutes les deux été impliquées. Comme décrit pour JARID1A dans les cellules HeLa, JARID1B joue un rôle positif dans l'élongation de la transcription dans les cellules ES de souris, en limitant la propagation de H3K4me3 dans la région codante (Kidder *et al*, 2014; Xie *et al*, 2011). Egalement, comme JARID1A, JARID1B interagit avec le complexe histone déacétylase MRG15, et est recrutée dans la région codante de gènes *via* le chromodomaine de MRG15 (qui lie H3K36me3). Le recrutement de JARID1B, comme celui de JARID1A, limite l'initiation cryptique de la transcription dans la région codante et s'accompagne de la déméthylation de la marque H3K4me3 (Xie *et al*, 2011). Là non plus, aucun lien n'a été fait entre ces deux études.

Il semble donc que JARID1A et JARID1B puissent dans certains contextes avoir des fonctions redondantes. Cela a été notamment montré dans la répression de gènes cibles de E2F impliqués dans le cycle cellulaire au cours de la sénescence induite en surexprimant l'oncogène Ras (Chicas *et al*, 2012). Islam *et al*. proposent que JARID1B, puissent compenser l'absence de JARID1A et montrent que sur certains gènes la déplétion de JARID1A conduit au recrutement de JARID1B (Islam *et al*, 2011).

### KDM5C

JARID1C/KDM5C également dénommée SMCX (Selected Mouse cDNA on X) est principalement connue pour son implication dans le syndrome du retard mental lié au chromosome X. En effet, des mutations perte de fonction dans le gène *JARID1C* sont responsables de cette maladie (Jensen *et al*, 2005; Tahiliani *et al*, 2007). Les mécanismes liant JARID1C à cette pathologie sont encore à l'étude. Il a été montré que JARID1C est en complexe avec le complexe répresseur REST et ses co-répresseurs transcriptionnels (HDAC1 et 2, et G9A) et est requise avec son activité déméthylase pour la répression par le complexe

REST, régulateur de gènes neuronaux. Cette étude suggère un lien entre JARID1C et le retard mental lié au chromosome X *via* la répression transcriptionnelle par le complexe REST (Tahiliani *et al*, 2007). Il a été montré dans les cellules embryonnaires de souris que JARID1C participe à moduler la fonction de promoteurs et d'enhancers en déméthylant H3K4. En effet les promoteurs actifs sont enrichis en H3K4me3 tandis que les enhancers sont marqués par H3K4me1. JARID1C est présente au niveau d'enhancers et de promoteurs, son activation entraîne une répression de l'activité transcriptionnelle des promoteurs et une activation des enhancers qui corrèlent avec la déméthylation de H3K4me3 à ces régions (Outchkourov *et al*, 2013).

#### KDM5D/JARID1D :

KDM5D/JARID1D/SMCY est le membre le moins étudié de la famille JARID1. JARID1D est codée par le gène *SMCY* situé sur le chromosome Y. *SMCY* appartient au locus AZF (Azoospermia Factor) impliqué dans la spermatogénèse (Navarro-Costa *et al*, 2010). Afin de mieux comprendre sa fonction dans la spermatogénèse, Akimoto et collaborateurs ont recherché des partenaires de JARID1D. JARID1D est en complexe avec la protéine MSH5 impliquée dans la recombinaison homologue au cours de la méiose. Le complexe JARID1D/MSH5 est recruté à la chromatine aux stages précoces de la condensation des chromosomes, où JARID1D déméthyle H3K4me3/me2. La déplétion de MSH5 n'affecte pas la déméthylation par JARID1D mais en revanche JARID1D est requise pour le recrutement de MSH5. Cette étude suggère un double rôle de JARID1D dans la méiose, d'une part, elle participerait à la condensation de la chromatine en déméthylant H3K4me3/H3K4me2 (associées à la décompaction de la chromatine) et d'autre part, elle participe au recrutement de MSH5 à la chromatine (Akimoto *et al*, 2008).

### III. La méthylation au delà des histones

Si nous nous intéressons à la méthylation des histones, il est important de rappeler que comme les autres modifications post-traductionnelles, la méthylation ne concerne pas que les histones.

Des protéines non histones comme les facteurs de transcription E2F1, p53 ou la méthyltransférase de l'ADN, DNMT1 peuvent être méthylées avec un impact sur leur fonction. Les KMT et les KDM peuvent cibler des protéines non histones et réguler leur activité (Mosammaparast & Shi, 2010). En ce qui concerne les KDMs, LSD1/KDM1A a été la plus étudiée pour sa capacité à cibler d'autres protéines que les histones, comme par exemple le facteur de transcription E2F1 (Mosammaparast & Shi, 2010). E2F1 a été impliqué dans l'activation de la transcription de gènes pro-apoptotiques comme *p73* (Attwooll *et al*, 2004). Il a été montré qu'en réponse aux dommages à l'ADN, E2F1 est méthylé sur sa lysine 185 par SET9 (capable de dimétyler H3K4). La méthylation de E2F1 K185 stabilise E2F1 et favorise la transcription de *p73* en réponse à des agents génotoxiques (doxorubicine et etoposide). La surexpression de LSD1 ou la déplétion de SET9 entraîne une diminution des niveaux de E2F1 et de son recrutement au promoteur de *p73* en réponse à ces agents génotoxiques. Ceci se traduit par une diminution de la transcription de *p73* et de la mort cellulaire. Dans ce même contexte LSD1 est capable de démétyler E2F1K185. Cette étude montre que la régulation de la stabilité de E2F1 par des KMT/KDM participe à la régulation de son activité pro-apoptotique (Kontaki & Talianidis, 2010).

LSD1 a également été impliquée dans la régulation de P53 *via* la déméthylation de p53 K370me2. P53 K370me2 inhibe l'activité de P53 en affectant sa capacité à lier l'ADN et à interagir avec la protéine 53BP1 impliquée dans la réponse aux dommages de l'ADN (Huang *et al*, 2007). D'autres enzymes de modification de la chromatine peuvent également être ciblées. En effet DNMT1 est méthylée par SET7/9 (au moins *in vitro*) et déméthylée par LSD1, ce qui conduit à sa stabilisation *in vivo* (Wang *et al*, 2009).

Les exemples cités ci-dessus illustrent l'importance de la méthylation dans la régulation de protéines histones. Si LSD1 a été étudiée dans ce type de processus, peu de choses sont connues sur l'implication des autres KDMs. Etudier ces processus sera sans doute un enjeu



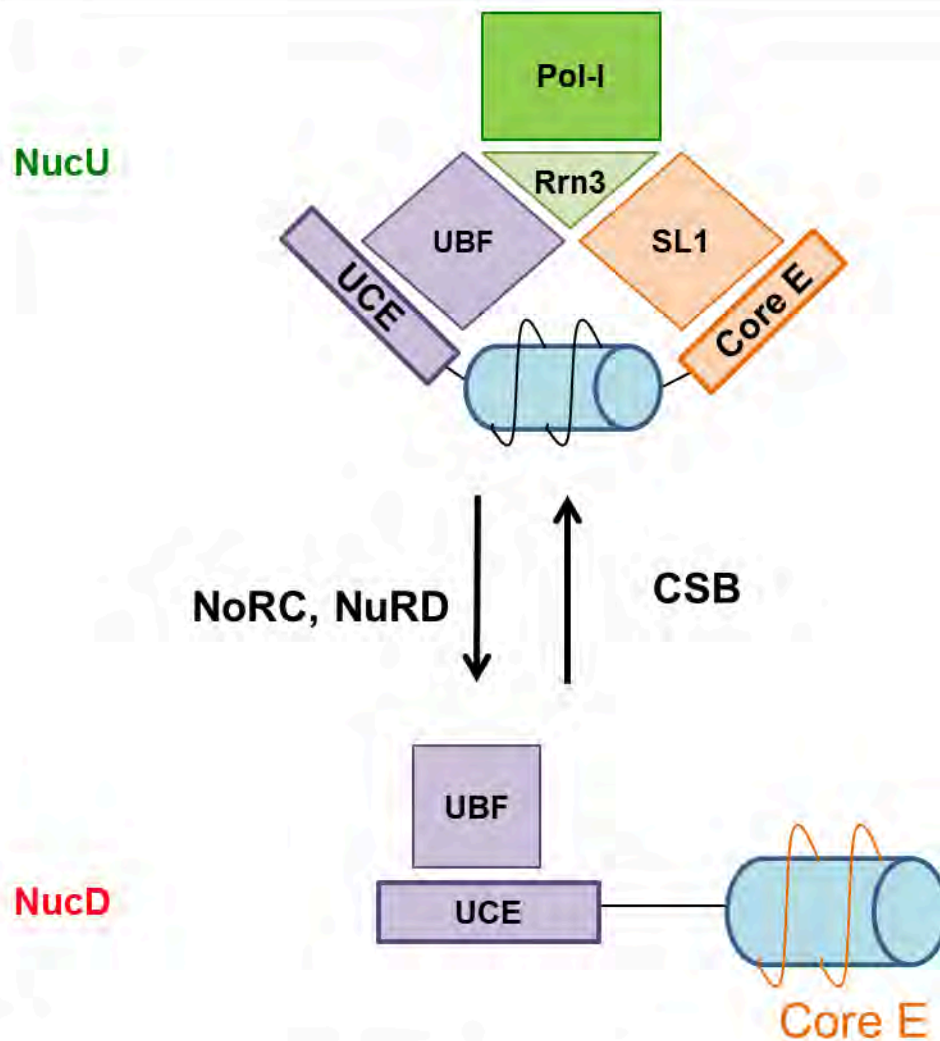
majeur dans les années à venir. Ceci permettra de mieux saisir la portée de l'implication des KMT/ KDMs dans la régulation des processus aussi bien chromatinien que non chromatinien. En effet, pour prendre l'exemple de la transcription, la spécificité de substrat vis-à-vis des histones ne permet pas toujours d'expliquer leur impact sur la transcription des gènes cibles. Cela pourrait impliquer la déméthylation de protéines autres que les histones qui seraient présentes dans un complexe multiprotéique contenant la déméthylase, ou capables d'interagir avec celle-ci. Différents exemples sont décrits dans le paragraphe VI-2 concernant KDM5A. Les substrats non-histones décrits à ce jour pour les KMTs et les KDMs sont présentés dans les Tableaux 3 et 4.

## C. Chromatine, méthylation sur lysines et régulation du programme épigénétique de la prolifération cellulaires : Les gènes ribosomiques et les gènes cibles de E2F

Au cours de ma thèse je me suis intéressé au rôle d'histones déméthylases dans la régulation transcriptionnelle des gènes ribosomiques et des gènes cibles de E2F. Dans cette rubrique je présente la régulation transcriptionnelle de ces gènes et les mécanismes chromatinien impliqués en mettant l'accent sur la méthylation des histones sur lysine.

### I. Chromatine et transcription des ADNr

Les gènes ribosomiques ou ADN ribosomiques (ADNr) codent pour le pré-ARN ribosomique qui sera mûr pour former les ARN ribosomiques 28S ; 18S et 5.8S qui portent l'activité catalytique de formation des liaisons peptidiques des ribosomes. Les ADNr sont des séquences répétées organisées en tandem (Goodfellow & Zomerdijk, 2012). Le nombre de copies des ADNr chez l'homme est estimé à 400. Chaque copie d'ADNr fait environ 43 kb dont 30Kb contenus dans une région appelée IGS (Intergenic spacer) constitués de séquences promotrices, d'enhancers et de terminateurs. Les 13kb restants constituent la région codante du pre-ADNr. En interphase, les gènes ribosomiques sont localisés dans un compartiment subcellulaire spécialisé dans la synthèse des ribosomes : le nucléole. Les ADNr sont transcrits par l'ARN Polymérase I (Pol-I) (Goodfellow & Zomerdijk, 2012). La transcription des ADNr en ARNr par la Pol-I est la première étape de la biogénèse des ribosomes. Ce processus majeur contrôle la synthèse protéique de la cellule et est étroitement lié à la croissance et la prolifération cellulaire. Les ADNr sont organisés en clusters appelés NOR (Nucleolar organiser region) autour desquels se forment les nucléoles, sites de la transcription Pol-I. Une transcription Pol-I accrue et des nucléoles hypertrophiés sont des caractéristiques communes à un grand nombre de cellules cancéreuses (Drygin *et al*, 2010). De ce fait, comprendre les mécanismes qui régulent la transcription Pol-I revêt une importance capitale.



**Figure 13 : Le positionnement des nucléosomes régule la formation du PIC, (représentation schématique)**

La formation du complexe de Pre-initiation (PIC) requiert le recrutement coopératif entre UBF qui se lie sur la séquence Upstream Core Element (UCE) et SL1 qui se lie sur le promoteur « cœur » (Core E pour Core Element).

Deux conformations ont été décrites pour les promoteurs des ADNr. La conformation permissive NucU (Nucleosome Upstream) dans laquelle le nucléosome au promoteur des ADNr occupe les positions -157 à -2 et la conformation réfractaire NucD (Nucleosome Downstream) dans laquelle le nucléosome au promoteur est positionné 24 pb en aval. La conformation permissive NucU rapproche spatialement les séquences UCE et Core E, permettant le recrutement coopératif de entre SL1 et UBF, et par conséquent la formation du PIC

Dans la conformation réfractaire NucD, la séquence Core E est séparée de la séquence UCE par l'octamère d'histone, empêchant le recrutement coopératif entre SL1 et UBF.

Les activités de remodelage de NoRC et NuRD permettent de mettre en place la conformation NucD.

L'activité de remodelage de CSB permet de mettre en place la conformation NucU,

## 1. La machinerie de transcription Pol-I

La première étape de la transcription Pol-I est la formation du complexe de pré-Initiation ou PIC (Pre initiation complex). Le facteur SL1 (Selectivity factor1 ou TIF1B chez la souris) reconnaît le « promoteur cœur » de l'ADNr via la TBP (TATA binding protein). SL1 est constitué de la TBP et des protéines associées TAF1A (ou TAF48), TAF1B (TAF63), TAF1C (TAF110) et TAF1D (TAF41) et TAF12. Il a été montré que le facteur UBF (Upstream Binding Factor) est requis pour la formation du PIC. En absence d'UBF il peut y avoir un niveau basal de transcription Pol-I, mais UBF est requis pour une transcription active (Goodfellow & Zomerdijk, 2012). UBF se lie sur une séquence appelée UCE (Upstream Core element) située environ 150 pb en amont du « promoteur cœur ». UBF interagit avec TBP et TAF1A et il a été mis en évidence que UBF et SL1 sont recrutés de manière coopérative (Goodfellow & Zomerdijk, 2012).

Le recrutement coopératif entre SL1 et UBF est régulé par le positionnement des nucléosomes au promoteur des ADNr (Li *et al*, 2006). Deux conformations ont été décrites pour les promoteurs des ADNr. Dans la conformation permissive appelée NucU (Nucleosome Upstream), le nucléosome lié au promoteur des ADNr occupe les positions -157 à -2. Cette conformation rapproche spatialement la séquence UCE et le « promoteur cœur », favorisant le recrutement coopératif (Li *et al*, 2006). Dans la conformation réfractaire appelée NucD (Nucleosome Downstream), le nucléosome est positionné 24 nucléotides en aval. Dans cette conformation, la séquence du « promoteur cœur » séparée de la séquence UCE par l'octamère d'histones. Cette conformation empêche donc le recrutement coopératif entre SL1 et UBF (Goodfellow & Zomerdijk, 2012; Grummt & Langst, 2012; Li *et al*, 2006) (**figure 13**).

L'ARN polymérase-I est constituée de 14 sous-unités protéiques. L'ARN polymérase-I est recrutée par SL1 via RRN3 (TIF1A chez la souris). Cette interaction fait intervenir les sous unités TAF1C, TAF1B et TAF1D de SL1 d'un côté et les sous unités A49 et A34.5 de la Pol-I de l'autre. UBF interagit également avec les sous unités PAF53 et PAF49 de l'ARN Pol-I. On retrouve associée à la Pol-1 la Sérine/Thréonine Kinase CK2. Cette protéine est capable de moduler l'assemblage et la stabilité du PIC en phosphorylant UBF et TAF1C (Goodfellow & Zomerdijk, 2012).

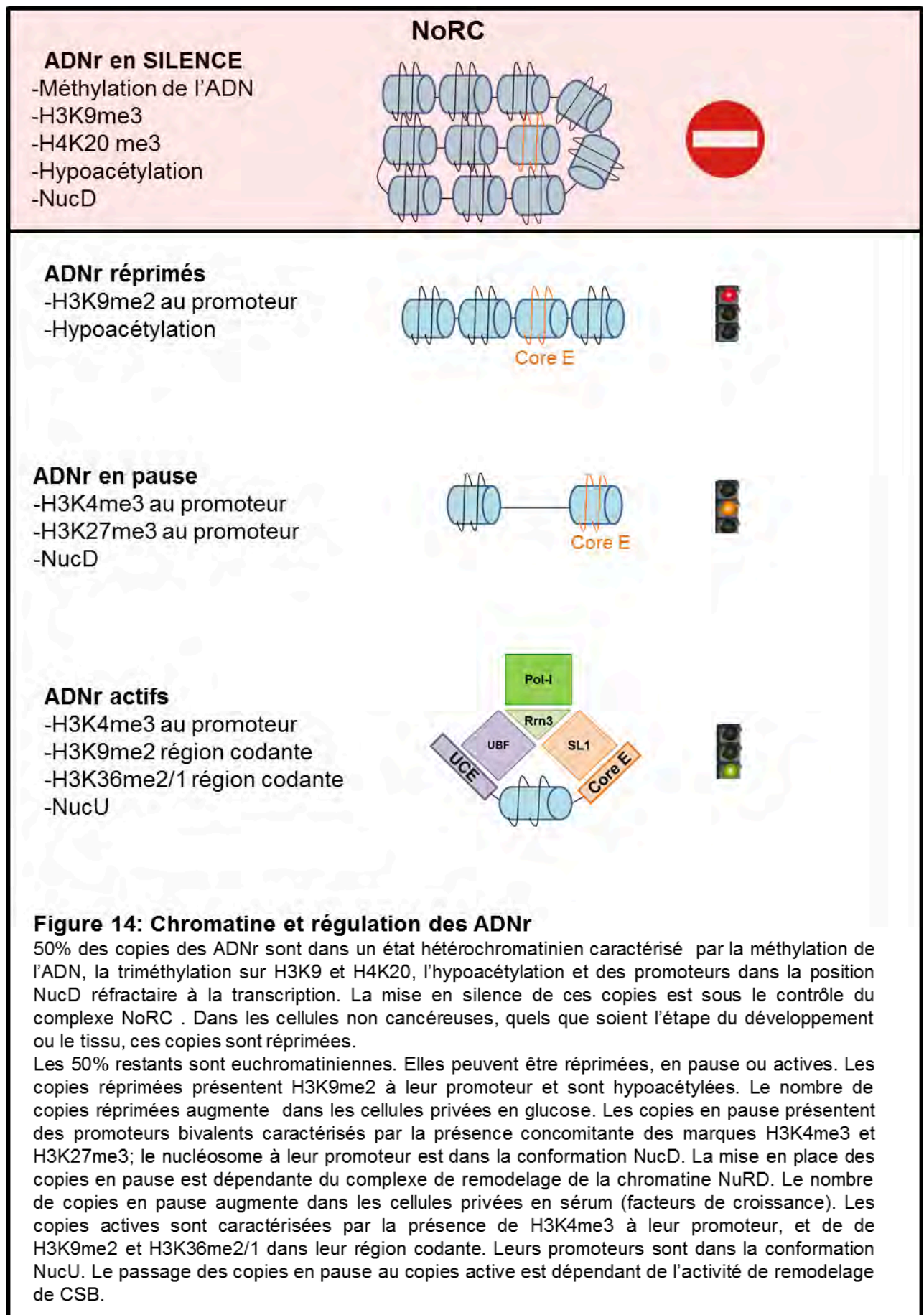
SL1 et UBF permettent donc de recruter *via* RRN3 L'ARN Pol-I pour former le complexe de Pré-initiation (PIC). Une fois le PIC formé, l'ARN Pol I se détachera du PIC et pourra démarrer la transcription. C'est la transition initiation-élongation. Pour des revues détaillant ces processus voir (Goodfellow & Zomerdijk, 2012; Grummt & Langst, 2012).

## 2. Chromatine et régulation de la transcription des ADNr

### a) Organisation des ADNr

50% des 400 copies des ADNr sont mises en silence. Dans une cellule normale ces copies restent en silence quel que soit le niveau de transcription Pol-I dans la cellule (Drygin *et al*, 2010). Les copies en silence des ADNr sont dans un état hétérochromatinien hautement compacté, caractérisé par la méthylation sur l'ADN, la présence des marques répressives H3K9me3 et H3K20me3 et l'absence d'acétylation sur les histones H3 et H4 (Grummt & Langst, 2012). Les promoteurs des ADNr en silence sont dans la conformation répressive NucD (Li *et al*, 2006) (**figure 13**)

Les 50% restant des ADNr sont euchromatiniens. Ils peuvent être réprimés ou actifs en fonction des besoins de la cellule. Réprimés par exemple lorsque les cellules sont privées en nutriments et/ou en facteurs de croissance, puis activés lorsque les nutriments/facteurs de croissance sont disponibles (Kusnadi *et al*, 2015). Les ADNr euchromatiniens réprimés sont caractérisés par la présence de H3K9me2 à leur promoteur, l'absence d'acétylation de H3 et H4 et de méthylation sur H3K36 dans leur région codante. Leurs promoteurs sont en conformation NucD (Grummt & Langst, 2012; Zentner *et al*, 2011). Les ADNr euchromatiniens actifs sont caractérisés par la présence de H3K4me3 à leur promoteur, l'acétylation sur H3, et H4, la présence de H3K9me2 et H3K36me2/me1 dans leur région codante et des promoteurs en conformation NucU (Grummt & Langst, 2012). Un troisième état intermédiaire dit en pause a été décrit récemment, qui faciliterait la mobilisation des ADNr pour la transcription. Les ADNr en pause sont caractérisés par la présence concomitante à leur promoteur des marques H3K4me3 et H3K27me3. Les promoteurs des ADNr en pause sont dans la conformation répressive NucD (Xie *et al*, 2012) (**figure 14**)



**Figure 14: Chromatine et régulation des ADNr**

50% des copies des ADNr sont dans un état hétérochromatinien caractérisé par la méthylation de l'ADN, la triméthylation sur H3K9 et H4K20, l'hypoacétylation et des promoteurs dans la position NucD réfractaire à la transcription. La mise en silence de ces copies est sous le contrôle du complexe NoRC. Dans les cellules non cancéreuses, quels que soient l'étape du développement ou le tissu, ces copies sont réprimées.

Les 50% restants sont euchromatinien. Elles peuvent être réprimées, en pause ou actives. Les copies réprimées présentent H3K9me2 à leur promoteur et sont hypoacétylées. Le nombre de copies réprimées augmente dans les cellules privées en glucose. Les copies en pause présentent des promoteurs bivalents caractérisés par la présence concomitante des marques H3K4me3 et H3K27me3; le nucléosome à leur promoteur est dans la conformation NucD. La mise en place des copies en pause est dépendante du complexe de remodelage de la chromatine NuRD. Le nombre de copies en pause augmente dans les cellules privées en sérum (facteurs de croissance). Les copies actives sont caractérisées par la présence de H3K4me3 à leur promoteur, et de de H3K9me2 et H3K36me2/1 dans leur région codante. Leurs promoteurs sont dans la conformation NucU. Le passage des copies en pause au copies active est dépendant de l'activité de remodelage de CSB.

Dans ce chapitre je présente les principales enzymes de modification de l'ADN et des histones qui régulent le paysage chromatinien des ADNr en silence et euchromatiniens actifs réprimés et en pause. Pour les acteurs régulant les ADNr euchromatiniens

Je replace lorsqu'elle est connue, leur implication dans l'adaptation de la transcription Pol-I à la disponibilité en facteurs de croissances ou en nutriments. Enfin, une courte rubrique sera consacrée aux voies de signalisation PI3K, MAP Kinase et mTOR, impliquées dans l'activation de la transcription Pol-I en réponse aux facteurs de croissance ou aux nutriments à travers leur implication dans la régulation de la machinerie de transcription Pol-I.

## b) Les ADNr en silence

Le complexe répresseur NoRC (Nucleolar remodeling complex) est responsable de la mise en silence des copies inactives des ADNr (Grummt & Langst, 2012; Santoro *et al*, 2002; Zhou *et al*, 2002). Comme décrit plus haut, ces copies sont caractérisées par méthylation sur l'ADN, l'absence d'acétylation sur les histones H3 et H4, la présence des marques répressives H3K9me3 et des promoteurs dans la conformation NucD. NoRC est un complexe de remodelage capable de déplacer des nucléosomes en utilisant l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP. NoRC est constitué de deux sous unités : une ATPase SNF2H et une protéine appelée TIP5 (TTF1 interacting Protein 5) (Strohner *et al*, 2001). L'activité de remodelage de la chromatine de NoRC permet d'établir la conformation répressive NucD au promoteur des ADN (Grummt & Langst, 2012; Li *et al*, 2006). NoRC agit également comme une plateforme qui permet le recrutement via TIP5 des ADN méthyltransférase DNMT1 et DNMT3, et du complexe répresseur Sin3 qui contient les histones déacétylases HDAC1 et HDAC2 (Zhou *et al*, 2002). Le recrutement de NoRC à la chromatine est dépendant de petits ARNs appelés pRNA. Les pRNA sont initiés à partir de promoteurs contenus dans les IGS et transcrits par l'ARN Pol-II (Mayer *et al*, 2006; Santoro *et al*, 2010). L'histone déacétylase SIRT1 a également été impliquée dans la répression par NoRC. En effet, l'interaction de TIP5 avec les pRNA requiert l'acétylation de la lysine K633 de TIP5 (TIP5 K633) par l'histone acétyltransférase MOF (Male absent on the First). Une fois recruté au promoteur TIP5 doit relarguer le pRNA pour permettre la répression. Ce relargage est dépendant de la déacétylation de TIP5 K633 par SIRT1. SIRT1 déacétyle également H4K16 au promoteur des ADNr. Ainsi, l'action du complexe NoRC conduit au silencing des ADNr (Zhou *et al*, 2009).



### c) Les ADNr euchromatiniens actifs :

Les copies actives des ADNr sont caractérisées par la présence de H3K4me3 à leur promoteur, l'acétylation sur H3 et H4 (Grummt & Langst, 2012), et la présence de H3K9me2 et H3K36me2/me1 dans leur région codante. Le nucléosome à leur promoteur est dans la position activatrice NucU. Le complexe CSB (Cockayne Syndrome B). CSB est un complexe de remodelage capable d'utiliser l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour moduler l'interaction ADN-histone (Beerens *et al*, 2005). CSB est présente dans les nucléoles et est requise pour le passage des nucléosomes dans la position NucU. CSB est recrutée en complexe avec l'histone méthyltransférase G9a, mono et di-méthyltransférase de H3K9 (Yuan *et al*, 2007). On retrouve H3K9me2 et HP1 $\gamma$  dans la région codante des gènes ribosomiques activement transcrits. Même si peu de choses sont connues à ce sujet, H3K9me2 et HP1 $\gamma$  ont été impliquées dans l'élongation de la transcription (Kwon *et al*, 2010b).

L'histone déméthylase PHF8 a été impliquée dans l'activation de la transcription Pol-I. PHF8 est recrutée au promoteur des ADNr *via* son domaine de liaison à H3K4me3 (Feng *et al*, 2010; Zhu *et al*, 2010). Le recrutement de PHF8 se traduit par la déméthylation de H3K9me2 au promoteur des ADNr et l'activation transcriptionnelle. La déplétion de PHF8 dans les cellules prolifératives entraîne une diminution de la transcription Pol-I (Feng *et al*, 2010; Zhu *et al*, 2010).

### d) Les ADNr euchromatiniens réprimés :

Les copies euchromatiniennes réprimées des ADNr sont caractérisées par la présence de H3K9me2 et l'absence de H3K4me3 à leur promoteur, l'absence d'acétylation de H3,H4 et de méthylation sur H3K36me2/1 dans leur région codante (Grummt & Langst, 2012).

Murayama *et al*. ont mis en évidence l'existence du complexe eNoSC (energy-dependant Nucleolar silencing complex) qui permet de réprimer la transcription Pol-I en réponse à la baisse du niveau d'énergie dans la cellule induit par privation de glucose (Murayama *et al*, 2008) . eNOSC est constituée de la KMT SUV39H1, de l'histone déacétylase SIRT1 et de la



protéine NML (Nucleomethiline) qui est requise pour le recrutement du complexe au promoteur des ADNr. Dans les cellules privées en glucose (faible niveau d'énergie), eNoSC est recrutée au promoteur des ADNr et réprime la transcription en diméthylant H3K9 (Suv39H1) et en déacétylant H4K16 (SIRT1) (Murayama *et al*, 2008). En plus de déacétyler H4K16, SIRT1 est capable d'activer SUV39H1. En effet, l'acétylation de la lysine 266 de SUV39H1 qui inhibe son activité méthyltransférase, est enlevée par SIRT1 (Vaquero *et al*, 2007). De façon intéressante, SIRT1 utilise comme co-facteur le NAD<sup>+</sup>. La privation en glucose entraîne une baisse du niveau d'ATP qui se traduit par une augmentation du niveau de NAD<sup>+</sup> dans la cellule. Ainsi, le complexe eNOSC via SIRT1 ferait un lien direct entre le statut énergétique de la cellule et la régulation chromatinienne de la transcription Pol-I.

Les histones déméthylases KDM2A (H3K36me2/me1), KDM2B (H3K4me3) et KDM7C (H3K9me2) ont été impliquées dans la répression de la transcription Pol-I.

L'histone déméthylase KDM2A/FBXL11 spécifique de H3K36me2 et me1 a été impliquée dans la répression des gènes ribosomiques dans les cellules privées en sérum et en glucose. La diminution de la transcription Pol-I suite à la privation corrèle avec une réduction des niveaux de H3K36me2 et me1 dans la région codante des gènes ribosomiques. Dans les cellules déplétées pour KDM2A ou surexprimant une forme mutée pour l'activité déméthylase, la répression de la transcription Pol-I en réponse à la privation est perdue, ce qui s'accompagne d'une augmentation des niveaux de H3K36me2 et H3K36me1 dans la région codante des ADNr (Tanaka *et al*, 2010) .

KDM2B/FBXL10 est présente dans les nucléoles et réprime la transcription Pol-I. Sa surexpression dans les cellules prolifératives se traduit par une diminution de la transcription Pol-I, et du nombre de nucléoles. KDM2B agit en déméthylant H3K4me3 au promoteur des ADNr. En effet la surexpression d'une forme sauvage de KDM2B entraîne une diminution de H3K4me3 aux promoteurs des ADNr tandis que la surexpression d'une forme mutée pour l'activité déméthylase n'a aucun effet sur la transcription Pol-I (Frescas *et al*, 2007). La privation des cellules en sérum qui entraîne une diminution de la transcription Pol-I corrèle avec une augmentation du recrutement de KDM2B sur les ADNr, qui est transitoirement perdue suite au rajout de sérum, suggérant que l'enlèvement de KDM2B du promoteur des ADNr est requise pour la réactivation de la transcription Pol-I en réponse au sérum (Frescas *et al*, 2007).

L'histone déméthylase KDM7C/PHF2 est capable d'enlever la marque H3K9me2. Toutefois Shi *et al.* ont montré qu'elle réprime la transcription des ADNr indépendamment de son activité déméthylase. PHF2 agirait en empêchant d'une part le recrutement de PHF8, et en favorisant d'autre part le recrutement de SUV39H1 au promoteur des ADNr (Shi *et al.*, 2014).

#### e) Les ADNr en pause

Les copies en pause des ADNr sont caractérisées par la présence concomitante à leur promoteur de H3K4me3 et de H3K27me3, et la position répressive NucD du nucléosome à leur promoteur (Xie *et al.*, 2012). Cet état serait un intermédiaire qui facilite la mobilisation de copies d'ADNr pour la transcription. Le complexe de remodelage de la chromatine NuRD est retrouvé au promoteur des copies des ADNr en pause. Xie *et al.* ont montré que la mise en place de ces copies en pause des ADNr requiert NuRD et sa sous unité ATPase CHD4. La déplétion de CHD4 se traduit par une diminution des niveaux de H3K4me3 et de H3K27me3 sur les ADNr, une diminution du nombre de nucléosomes en conformation NucD, et une baisse de la transcription Pol-I. L'activation des copies en pause des ADNr requiert l'activité de remodelage de CSB qui permet le passage du nucléosome au promoteur en conformation active NucU. La fraction d'ADNr en pause augmente dans les cellules privées en sérum. De plus la déplétion de CHD4 empêche la réactivation de la transcription Pol-I lors du rajout de sérum. Ces observations suggèrent un mécanisme dans lequel suite à la privation en sérum, des copies d'ADNr sont mises en pause via NuRD/CHD4, et seront activées de façon CSB dépendante lors du rajout de sérum pour permettre la réactivation de la transcription Pol-I (Xie *et al.*, 2012).

La régulation des ADNr *via* la chromatine a fait l'objet d'une revue très détaillée par Grummt et Längst (Grummt & Langst, 2012). Le tableau 5 présente les principales activités de la méthylation de l'ADN, de modification des histones et les complexes de remodelage impliqués dans la régulation de la transcription des ADNr.

Régulateurs épigénétiques de la transcription de l'ADNr	Activité	Fonction nucléolaire
Régulateurs de la méthylation de l'ADN		
Dnmt1	ADN méthyltransférase	Répresseur
Dnmt3a	ADN méthyltransférase	Répresseur
Dnmt3b	ADN méthyltransférase	Répresseur
GADD45a	ADN déméthylase	Activateur
MeCP2	Protéine se liant à l'ADN méthylé	Répresseur
MBD1	Protéine se liant à l'ADN méthylé	Répresseur
MBD2	Protéine se liant à l'ADN méthylé	Répresseur
MBD3	Protéine se liant à l'ADN méthylé	Activateur / Répresseur
Enzymes modifiant les histones		
CBP	Acétyltransférase	Activateur
MOF	Acétyltransférase	Répresseur
PCAF	Acétyltransférase	Activateur
p300	Acétyltransférase	Activateur
HDAC1	Déacétylase d'histone	Répresseur
HDAC2	Déacétylase d'histone	Répresseur
SirT1 (mSir2a)	Déacétylase dépendante du NAD <sup>+</sup>	Répresseur
SirT7	Déacétylase dépendante du NAD <sup>+</sup>	Activateur
KDM2A	H3K36 KDM	Répresseur
KDM2B (JHDM1B, FBXL10)	H3K4 KDM	Répresseur
PHF8	H3K9 KMT	Activateur
G9a	H3K9 KMT	Activateur
PRMT5	Méthyltransférase d'arginine	Répresseur
Suv39H1	H3K9 KMT	Répresseur
Facteurs de remodelage de la chromatine		
ATRX	Hélicase ATP-dépendante	Répresseur
CHD4	ATPase/hélicase	Activateur / Répresseur
CHD7	Hélicase ATP-dépendante	Activateur
CSB	ATPase dépendante de l'ADN	Activateur
SNF2H	ATPase dépendante de l'ADN	Activateur / Répresseur
TIP5	Large sous-unité de NoRC	Répresseur
NuRD	Complexe de remodelage et de déacétylation des nucléosomes	Activateur / Répresseur
FACT	Chaperonne d'histone	Activateur

**Tableau 5 : Régulateurs épigénétiques de la transcription des ADNr. (Adapté de Grummt and Längst 2012)**

### 3. Activation de la Transcription Pol-I en réponse aux facteurs de croissance et aux nutriments : les voies MAP Kinase, mTOR et PI3K

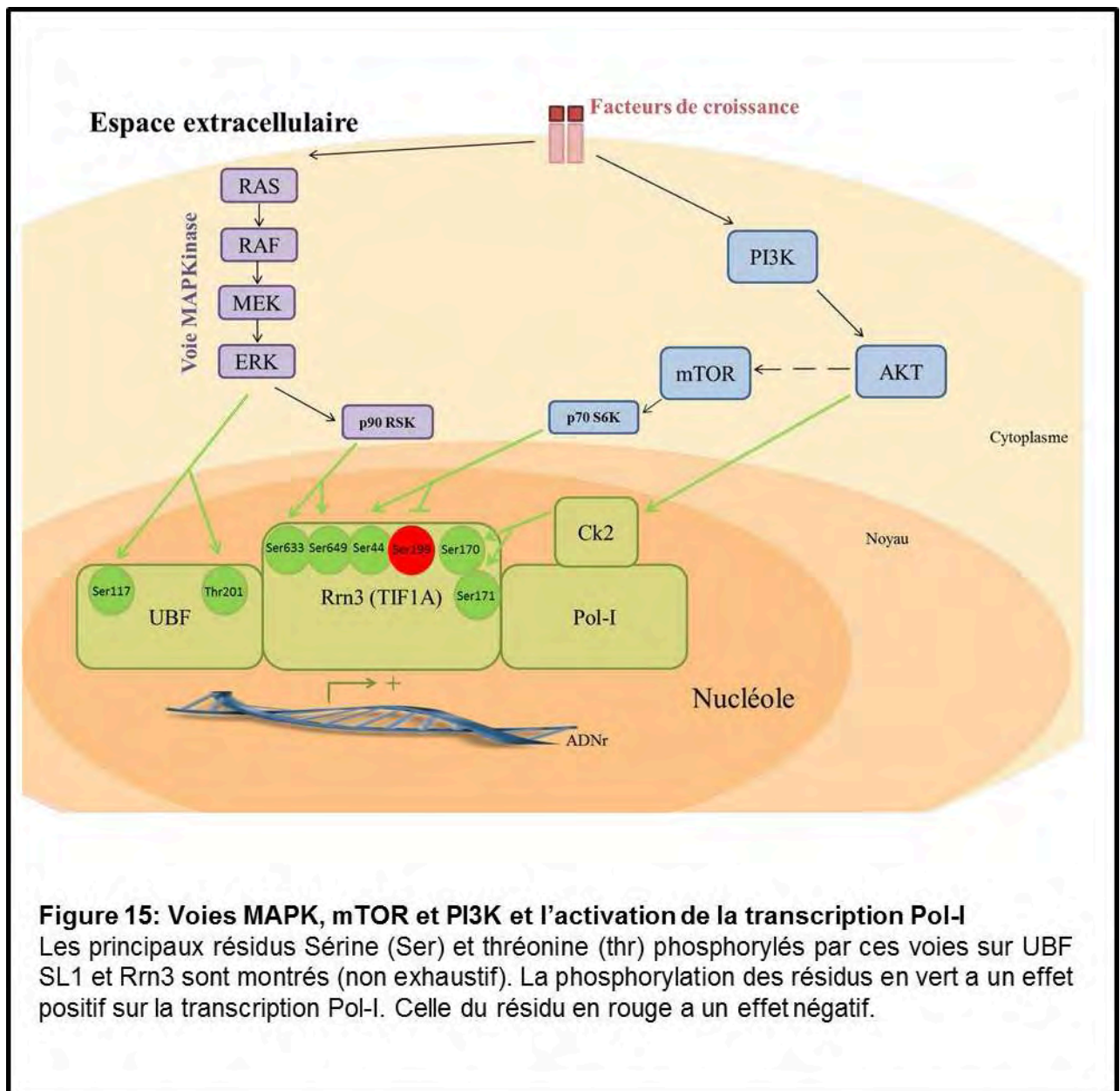
Comme évoqué plus haut, la régulation de la transcription Pol-I en fonction de la disponibilité en facteurs de croissance et en nutriments est sous le contrôle de différentes voies de signalisation cellulaire (Kusnadi *et al*, 2015). Ici, je présente brièvement les voies MAP kinase, mTOR et PI3K qui ont été impliquées dans l'activation de la transcription Pol-I, et les mécanismes décrits de cette activation.

#### a) La voie ERK/MAP Kinase :

ERK (Extracellular Regulated Kinase) appartient à la famille des MAP Kinases (Mitogen Associated Protein Kinases). La voie ERK traduit des signaux extracellulaires (*via* l'activation des récepteurs à activité tyrosine kinase, RTK) pour conduire à des modulations de la transcription (Kusnadi *et al*, 2015). Cette voie est fréquemment activée dans les cancers. La voie ERK/MAP Kinase régule la transcription Pol-I en ciblant UBF et TIF1A (Rrn3). La phosphorylation de UBF sur les thréonines (Thr117 et Thr201) par ERK est requise pour l'élongation de la transcription (Stefanovsky *et al*, 2001). ERK *via* sa protéine effectrice RSK (p90 ribosomal S6 kinase) conduit à la phosphorylation de deux sérines de TIF1A (Ser 633 et ser649). Ces phosphorylations sont requises pour l'activation de la transcription Pol-I (Zhao *et al*, 2003). (**figure 15**)

#### b) La voie mTOR :

mTOR (Mammalian target of Rapamycin) est une kinase qui régule la croissance cellulaire, la prolifération, la mobilité cellulaire, la synthèse protéique et la transcription. La voie mTOR a été impliquée dans l'activation de la transcription Pol-I en réponse aux nutriments notamment les acides aminés (Claypool *et al*, 2004; Mayer *et al*, 2004). Le traitement à la rapamycine entraîne une inhibition de la transcription Pol-I qui s'accompagne de la baisse de la phosphorylation de la Serine 44 de TIF1A et de l'augmentation de phosphorylation de sa sérine 199. La sérine 44 est requise pour l'activité de TIF-1A tandis que la sérine 199



**Figure 15: Voies MAPK, mTOR et PI3K et l'activation de la transcription Pol-I**

Les principaux résidus Sérine (Ser) et thréonine (thr) phosphorylés par ces voies sur UBF SL1 et Rrn3 sont montrés (non exhaustif). La phosphorylation des résidus en vert a un effet positif sur la transcription Pol-I. Celle du résidu en rouge a un effet négatif.

l'inactive. La rapamycine empêche l'association de TIF-1A avec SL1 et la Pol-I entraînant une perte de la formation du PIC (Hannan *et al*, 2003) (**figure 15**).

### c) La voie PI3K-AKT :

La voie PI3K (Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase)-AKT régule la transcription Pol-I en réponse aux facteurs de croissance. PI3K activé produit des phosphoinositide 3 phosphate, qui conduisent à l'activation notamment de la kinase AKT (Martini *et al*, 2014). La voie PI3K/AKT a été impliquée dans la régulation de la transcription des gènes ribosomiques. AKT agit notamment en activant la voie mTOR (Kusnadi *et al*, 2015). Toutefois il a été montré qu'AKT peut activer la transcription Pol-I indépendamment de la voie mTOR en modulant l'activité de TIF1A. Cette régulation passe la kinase CK2 (Casein Kinase II) activée par AKT. CK2 à son tour active la transcription Pol-I en phosphorylant les sérines S170 et S172 de TIF1A (Nguyen le & Mitchell, 2013). Ces phosphorylations sont requises pour la transition initiation-élongation (Bierhoff *et al*, 2008). L'expression de formes constitutivement actives de AKT dans les cellules privées en facteurs de croissance entraîne une dérégulation de la transcription Pol-I, montrant qu'AKT est impliquée dans la réponse de la transcription Pol-I à la disponibilité en facteurs de croissance (Chan *et al*, 2011)(**figure 15**).

Les voies de signalisation régulant la transcription des ADNr en réponse à la disponibilité en facteurs de croissances et en nutriment ont fait l'objet d'une revue récente et très exhaustive par Kusnadi et collaborateurs (Kusnadi *et al*, 2015).

## II. Chromatine et transcription des gènes cibles de E2F

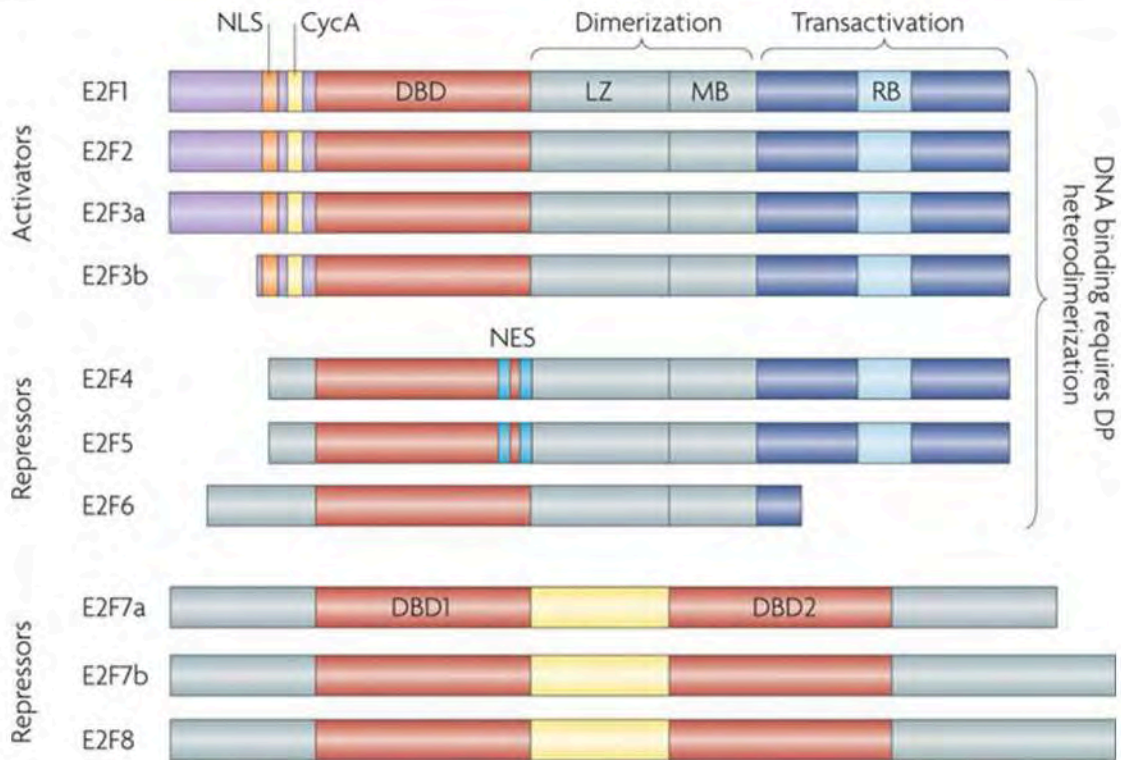
### 1. Les facteurs de transcription E2Fs :

La famille des facteurs de transcription E2Fs comprend les facteurs E2F1 à E2F8 (avec deux isoformes de E2F3 (E2F3a et E2F3b) et de E2F7 (E2F7a et E2F7b). Les facteurs E2F régulent la transcription de gènes impliqués dans l'entrée et la progression en phase S comme *CCNE1*, *CDC6* ou *DHFR*. Ces gènes sont activés à la transition G1/S et réprimés en dehors de la phase S (Zhan *et al*, 2014). Toutefois, le rôle des facteurs E2Fs ne se limite pas à la régulation de gènes de la phase S. Par exemple E2F1 est requis pour l'apoptose et régule l'expression de gènes pro-apoptotiques comme *ARF*, *p73*, *Casp3* ou *Casp7*. L'isoforme E2F3b est recruté sur des gènes impliqués dans la différenciation musculaire et est requis pour la différenciation musculaire (Attwooll *et al*, 2004; Chen *et al*, 2009; Zhan *et al*, 2014). E2F6 a été impliqué dans la répression des gènes homéotiques (Takeda *et al*, 2006).

Sur la base de leur rôle dans la régulation des gènes du cycle cellulaire, et de leur structure, les facteurs E2Fs sont classés en deux catégories : Les E2Fs activateurs (E2F1 à E2F3), et les E2Fs répresseurs (E2F4 à E2F8). Les facteurs E2F possèdent un domaine de liaison à l'ADN dans leur partie N-terminale conservé entre tous les membres de la famille E2F et qui leur permet de se lier à leur séquence consensus TTTCCCGC. E2F1 à E2F6 fonctionnent en hétérodimère avec l'une des trois protéines DP (pour Dimerisation Partner ; DP1, DP2/3 ou DP4). L'interaction avec la protéine DP se fait via un domaine de dimérisation situé dans la partie centrale des E2F. Ce domaine est absent dans E2F7 et E2F8 qui fixent l'ADN sans doute comme un homodimère (**figure 16**) (Chen *et al*, 2009; Zhan *et al*, 2014).

Les facteurs E2F 1 à 5 présentent un domaine transactivateur dans leur partie C-Terminale. Ce domaine contient une séquence de liaison aux protéines à poche (Rb la protéine du Rétinoblastome et les protéines apparentées p107 et p130). Les facteurs E2F1 à 3 interagissent préférentiellement avec Rb tandis que E2F4 et E2F5 interagissent avec p107 et p130 (Attwooll *et al*, 2004). Ces protéines à poche régulent l'activité des facteurs E2F1-5 (Henley & Dick, 2012). Lorsqu'ils sont en complexe avec une protéine à poche, les facteurs E2F1 à E2F5 se comportent comme des répresseurs transcriptionnels. Leur domaine transactivateur est inhibé et ils recrutent, via les protéines à poche, des co-répresseurs transcriptionnels. La phosphorylation des protéines à poches par les complexes CDK-cyclines entraîne leur dissociation du facteur E2F (Henley & Dick, 2012). Lorsque leur domaine de





**Figure 16: Structure et caractéristiques des facteurs E2F**

Les facteurs E2F possèdent un domaine de liaison à l'ADN (DBD pour DNA Binding domain) conservé entre tous les membres. Les 8 facteurs E2F sont exprimés à partir de 8 gènes différents. Le gène *E2F3* code pour deux isoformes E2F3a et E2F3b initiés à partir de promoteurs alternatifs. E2F7a et E2F7b sont issus d'un épissage alternatif. Les facteurs E2F1 à E2F6 se lient à l'ADN en hétérodimère avec des protéines DP. Il existe 3 protéines DP, DP1 à DP3. Cette interaction se fait via les domaines Leucine Zipper (LZ) et Marked box (MB). Contrairement aux E2F activateurs, E2F4 est capable d'interagir avec les 3 protéines à poches. Et E2F5 interagit préférentiellement avec p130. Les facteurs E2F activateurs possèdent un domaine de translocation nucléaire (NLS pour Nuclear localization sequence), et un domaine de liaison à la cycline E. E2F4 et E2F5 possèdent un domaine bipartite d'export du noyau (NES pour Nuclear export sequence) qui permet leur export vers le cytoplasme. Les E2F6 à E2F8 ne possèdent pas la région C-terminale responsable de l'interaction avec les protéines à poche.

*Chen tsai et al 2009*



transactivation est ainsi libéré, les facteurs E2F dits "activateurs" (E2F1-3) peuvent recruter des co-activateurs transcriptionnels. Les facteurs E2F répresseurs (E2F4-5), lorsqu'ils ne sont pas en complexe avec une protéine à poche, ont une faible capacité de transactivation (Chen *et al*, 2009; Zhan *et al*, 2014).

Les facteurs E2F6 à 8, ne possèdent pas de domaines activateurs ni de domaines d'interaction avec les protéines à poche. De ce fait ils sont considérés comme des répresseurs indépendants des protéines à poches (Chen *et al*, 2009).

## 2. *Chromatine et Régulation transcriptionnelle des gènes cibles de E2F :*

Ainsi, les facteurs E2F régulent la transcription *via* le recrutement de co-régulateurs transcriptionnels. Ces co-régulateurs sont principalement des enzymes de modification des histones et des complexes de remodelage qui *via* la chromatine régulent la transcription des gènes cibles. Ainsi, dans les cellules en G0 ou en début de G1, les promoteurs des gènes cibles de E2F sont réprimés et caractérisés par la méthylation sur H3K9 et l'hypoacétylation sur H3 et H4 (Nicolas *et al*, 2003). Lorsque ces gènes sont activés à la transition G1/S leur promoteur présentent les méthylations H3K4me3, H3R17 et H3R26, et sont hyperacétylés sur H3 et H4 (Chen *et al*, 2009; El Messaoudi *et al*, 2006; Tyagi *et al*, 2007). Dans les cellules différenciées ou sénescents, qui sortent du cycle de façon irréversible, ces gènes sont placés dans un état de répression stable caractérisé par la tri-méthylation de H3K9 et H3K27, la déméthylation de H3K4 et l'hypoacétylation à leur promoteur (Blais & Dynlacht, 2007; Blais *et al*, 2007; Narita *et al*, 2003; van Oevelen *et al*, 2008) . Les mécanismes chromatinien qui répriment les gènes cibles de E2F en fin de phase sont moins connus.

Dans ce chapitre je présente les enzymes de modification des histones impliquées dans la mise en place du paysage chromatinien des gènes cibles des facteurs E2F, lors de l'arrêt irréversible du cycle cellulaire, en G0/G1 et à la transition G1/S. Je termine sur les facteurs E2F6-8 qui sont impliqués dans la répression de ces gènes en fin de phase S, étape dont les mécanismes moléculaires sont moins documentés.

a) -La sortie irréversible du cycle cellulaire : la différenciation et la sénescence :

Au cours de la différenciation cellulaire ou de la sénescence, la sortie du cycle cellulaire est irréversible, au contraire de l'état de quiescence des cellules non différenciées (telles que les cellules souches adultes ou les modèles expérimentaux comme les cellules privées en sérum) qui peuvent en réponse à un stimulus donné repartir dans le cycle. La sortie irréversible du cycle cellulaire s'accompagne de la répression stable des gènes cibles de E2F impliqués dans le cycle cellulaire (Chicas *et al*, 2010). Cette répression stable s'accompagne de la triméthylation de H3K9me3 et H3K27me3 à leur promoteur, de la déméthylation de H3K4me3 et de la déacétylation (Ait-Si-Ali *et al*, 2004; Narita *et al*, 2003; Vandromme *et al*, 2008; Vaute *et al*, 2002). La mise en place de ce paysage chromatinien, aussi bien en sénescence que lors de la différenciation cellulaire est médiée par les protéines à poche et notamment Rb qui interagissent avec des histones méthyltransférases, des histones déacétylases et des histones déméthylases (Chen *et al*, 2009; Chicas *et al*, 2010; Narita *et al*, 2003).

Dans les cellules en différenciation ou en sénescence, Rb interagit avec l'histone méthyltransférase Suv39H requise pour la mise en place de H3K9me3 au promoteur des gènes cibles de E2F (Ait-Si-Ali *et al*, 2004; Narita *et al*, 2003). Rb interagit également avec les histone déacétylases HDAC1 et HDAC2. Le complexe répresseur histone déacétylase sin3B qui contient HDAC1 et HDAC2 est requis pour la déacétylation au niveau des gènes cibles de E2F lors de la différenciation et de la sénescence (Grandinetti *et al*, 2009; van Oevelen *et al*, 2008). Rb interagit également avec les histones déméthylases JARID1A et JARID1B. JARID1A et JARID1B déméthylent H3K4me3 au promoteur des gènes cibles de E2F lors de la sénescence et de la différenciation cellulaire (Chicas *et al*, 2012; van Oevelen *et al*, 2008) .

La répression de certains gènes du cycle cellulaire comme *Mcm5*, *Cdc25*, *Mcm3* et *CycD* au cours de la différenciation musculaire s'accompagne de la triméthylation sur H3K27 à leur promoteur, de façon Rb dépendante mais Polycomb indépendante (Blais *et al*, 2007).

b) -La répression en G0 et G1 :

Dans les cellules en G0 et G1, les gènes cibles de E2F sont comme évoqué plus haut dans un état réprimé caractérisé par la méthylation sur H3K9 à leur promoteur et l'hypoacétylation (Chen *et al*, 2009; Nicolas *et al*, 2003; Zhan *et al*, 2014).

La répression des gènes de la phase S dans les cellules en G0 (quiescence) et G1 se fait via des complexes E2F/protéine à poche. E2F4 et E2F5 sont les E2Fs exprimées dans les cellules quiescentes (les E2Fs activateurs E2F1-3 sont activés peu avant la phase S, ils sont eux-mêmes des gènes cibles de E2F) (Chen *et al*, 2009; Zhan *et al*, 2014).

Il a été montré dans des fibroblastes NIH3T3 induits en quiescence par privation de sérum que E2F4 *via* p130 recrute le complexe répresseur mSin3B et l'histone déacétylase HDAC1 dans la répression de gènes du cycle cellulaire (Ferreira *et al*, 2001; Rayman *et al*, 2002). HP1 et l'histone méthyltransférase Suv39H, spécifique de H3K9, recrutées *via* Rb, ont été impliquées dans la répression de gènes cibles de E2F, comme par exemple la Cycline E, dans des fibroblastes de souris (Nicolas *et al*, 2003; Nielsen *et al*, 2001) . Les fibroblastes déplétés pour SUV39H1/H2 présentent une augmentation de l'expression de la Cycline E (Nielsen *et al*, 2001). Rb recrute également l'histone déacétylase HDAC1 sur le promoteur de la cycline E (Brehm *et al*, 1998; Magnaghi-Jaulin *et al*, 1998). La déplétion de HDAC1 dans des fibroblastes NIH3T3 en prolifération entraîne une augmentation de la transcription de *DHFR*, gène cible de E2F impliqué dans la phase S (Ferreira *et al*, 2001).

c) -Activation à la transition G1/S

A la transition G1/S, les protéines à poche sont phosphorylées par les complexes CDK/Cycline. Les facteurs E2Fs activateurs pourront recruter des co-activateurs *via* leur domaine de transactivation (Henley & Dick, 2012).

Les co-activateurs recrutés par les E2Fs activateurs incluent des histone-acétyltransférases et des histone-méthyltransférases. Une histone déméthylase, PHF8 spécifique de H4K20, a été impliquée dans ce processus. Les facteurs E2F recrutent également la sous-unité TFIID du complexe ARN polymérase (Ross *et al*, 1999).

Ainsi, il a été montré que dans les cellules prolifératives, E2F1 recrute les histones acétyl-transférases p300/CBP (Ait-Si-Ali *et al*, 2000), GCN5, TIP60 (Taubert *et al*, 2004) .

L'histone arginine méthyltransférase CARM1 (PRMT4) a été impliquée dans l'activation transcriptionnelle par E2F1 de la cycline E1 (*Ccne1*) à la transition G1/S. L'activation de *Ccne1* gène cible de E2F à la transition G1/S s'accompagne du recrutement de CARM1 et de la méthylation de H3R17 et H3R26. CARM1 est recrutée au promoteur de *Ccne1* *via* la protéine ACTR qui interagit avec E2F1. Des tests de transactivation montrent que CARM1 participe à l'activation transcriptionnelle de *Ccne1* par E2F1. Comparés à des cellules sauvages, les fibroblastes embryonnaires murins déplétés pour CARM1, synchronisés en G0 par privation en sérum présentent une activation plus faible de la transcription de *Ccne1* en réponse au sérum (El Messaoudi *et al*, 2006).

Plusieurs études ont montré que les KMT H3K4 spécifiques MLL sont impliquées dans l'activation de gènes cibles de E2Fs. Les facteurs E2F activateurs permettent le recrutement de MLL et MLL2 au promoteur de la cycline E. Le recrutement des MLL par les facteurs E2F lors de l'activation de gènes du cycle se fait *via* le complexe HCF-1 (Host Cell Factor-1) qui interagit avec E2F1 à la transition G1/S. La déplétion des complexes MLL ou de HCF-1 entraîne une diminution de H3K4me3 au promoteur de *CCNE1* et sa répression transcriptionnelle (Takeda *et al*, 2006; Tyagi *et al*, 2007).

L'histone déméthylase PHF8, capable de déméthyliser H4K20me1 est requise pour le recrutement de HCF1 au promoteur des gènes cibles de E2F comme *CCNE1*, *CDC25A* ou *E2F1*. PHF8 est capable de déméthyliser la marque répressive H4K20me1. La déplétion de PHF8 entraîne la perte du recrutement de HCF1 au promoteur de ces gènes cibles et s'accompagne de l'augmentation de la marque répressive H4K20me1 (Liu *et al*, 2010b).

d) -La répression en fin de phase S :

Les facteurs répresseurs E2F4 et E2F5 ne sont pas recrutés sur les gènes cibles dans les cellules en phase S (Takahashi *et al*, 2000). La répression en fin de phase S fait intervenir les facteurs E2F6 (Giangrande *et al*, 2004; Leung & Nevins, 2012), E2F7 (Westendorp *et al*, 2012) et E2F8 (Christensen *et al*, 2005). Cependant, il a été décrit que E2F4 pouvait compenser l'absence de E2F6 dans les cellules déplétées pour ce facteur (Giangrande *et al*, 2004).

Aucun des facteurs E2F6-8 ne possède de domaine d'interaction avec les protéines à poche. Leur découverte est plus récente que les autres E2F. Aussi, leurs mécanismes d'action et l'identité des protéines co-régulatrices avec lesquelles ils s'associent sont encore à l'étude.

Quelques études se sont attachées à identifier des co-répresseurs des facteurs E2F6-8. Il a ainsi été décrit que E2F7 s'associe avec CtBP (C-terminal Binding Protein), un co-répresseur capable d'interagir avec les histones déacétylases HDAC1, HDAC2 et le complexe de remodelage NuRD impliqué dans la répression transcriptionnelle. Des tests de transactivation montrent que E2F7 et CtBP coopèrent pour contrebalancer l'activation transcriptionnelle par E2F1 (Liu *et al*, 2013; Zhao *et al*, 2014). Au regard des gènes cibles de E2F, il a été montré que E2F6 interagit avec l'ATPase BRG1 du complexe de remodelage SWI/SNF. E2F6 et BRG1 sont co-recrutées sur les promoteurs de gènes cibles de E2F (*CDC6, E2F1, PCNA, TK*) pendant la phase S. Des tests de transactivation dans les cellules de glioblastome humaines T98G montrent que BRG1 est requise pour la répression du promoteur de E2F1 par E2F6 (Leung & Nevins, 2012). E2F6 interagit également avec des protéines du complexe répresseur Polycomb (Giangrande *et al*, 2004; Ogawa *et al*, 2002; Stielow *et al*, 2014). Des études fonctionnelles dans des cellules synchronisées seront nécessaires pour tester l'implication de ces partenaires dans la répression de gènes au cours de la phase S.

Le tableau 6 dresse un récapitulatif des activités de modification des histones impliquées dans la régulation des gènes cibles de E2F et détaillées ci-dessus.

	Enzymes	Activité	Principaux E2F impliqués	Protéines à poche
G0/G1	HDAC1 Suv39	Histone déacétylase H3K9 méthyltransférase	E2F4, E2F5	Rb, p130, p107
G1/S	Tip60, GCN5, CBP/p300 MLL CARM1 PHF8	Histone Acétyltransférase H3K4 méthyltransférase H3R17, H3R26 méthyltransférase H2K20 méthyltransférase	E2F1-3	
Diff. / Sénescence	Suv39H HDAC1 - HDAC2 Jard1A Jard1B	H3K9 méthyltransférase Histone déacétylase H3K4 déméthylase H3K4 déméthylase	E2F4, E2F5	Rb, p130, p107
Fin de phase S	?	?	E2F6-8	

**Tableau 6: Activités de modification des histones impliquées dans la régulation des gènes cibles de E2F**

## Objectifs de la thèse:

Mon travail de thèse visait à comprendre comment les histone-déméthylases JMJD2A/KDM4A, JARID1A/KDM5A, JARID1B/KDM5B interviennent dans la régulation des processus chromatinien et en particulier la transcription. Je me suis intéressé aux mécanismes moléculaires qui régulent la transcription des gènes ribosomiques et des gènes cibles de E2F, deux classes de gènes clés de la croissance et de la division (prolifération) cellulaires. La compréhension des mécanismes chromatinien mis en jeu est d'une importance capitale pour appréhender la régulation de ces deux processus essentiels à la vie de la cellule et dérégulés dans les cancers.

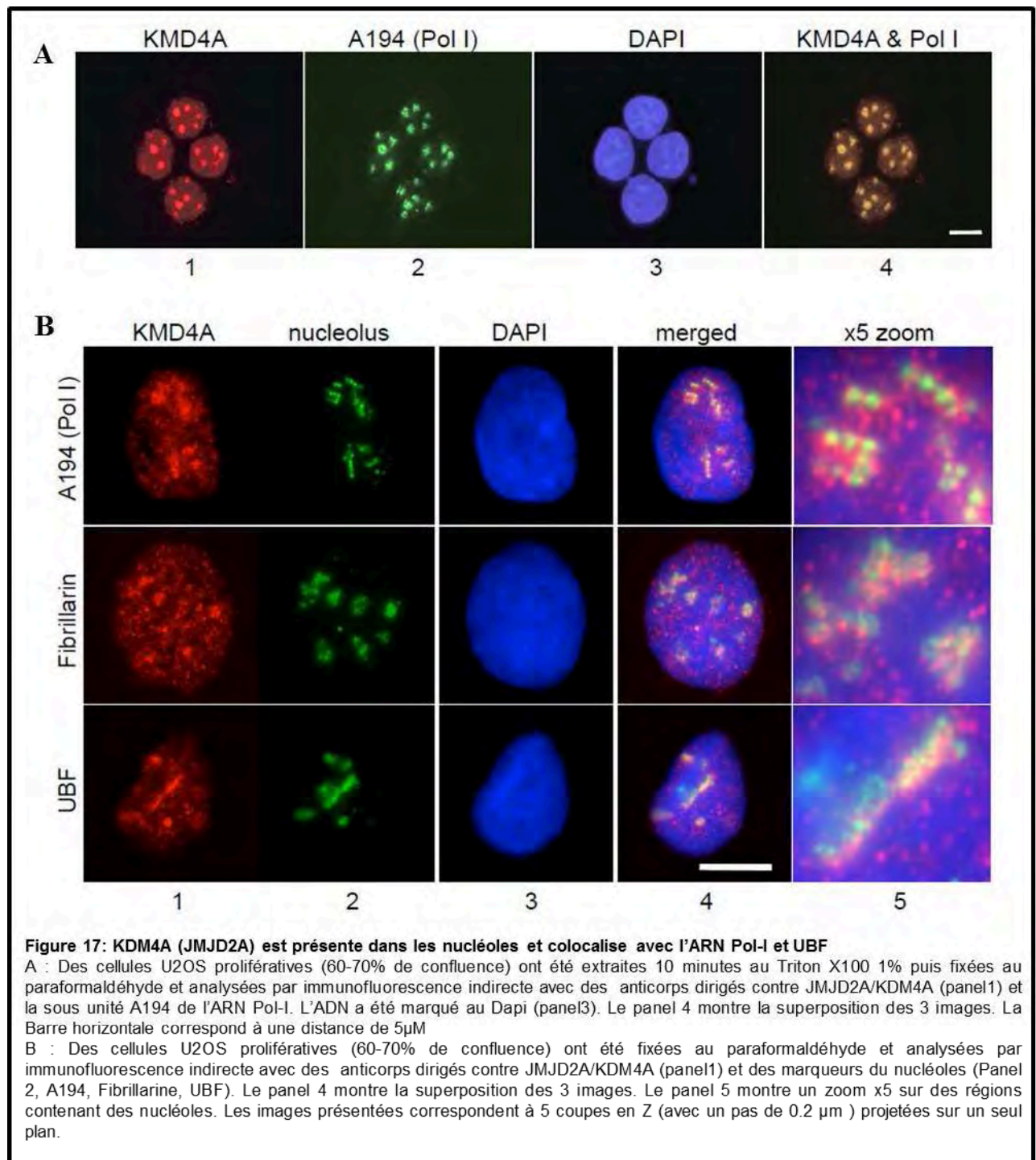
Les méthylations sur H3K4me3/2 et H3K9me3/2 régulent la transcription de façon antagoniste. Ainsi, H3K4me3/2 marque le promoteur des gènes actifs alors que H3K9me3/2 est une marque répressive de la transcription. Ces deux marques sont mutuellement exclusives. Les histones déméthylases JMJD2A et JARID1A/B sont capables d'enlever les marques de méthylation H3K9me3/2 et H3K4me3/2, respectivement. Je me suis intéressé à l'implication de ces KDMs dans le passage d'un état actif de la transcription (H3K4 méthylé, H3K9 déméthylé) à inactif (H3K4 déméthylé, H3K9 méthylé) ou inversement.

Au début de ma thèse, il était documenté que la méthylation des histones participait à la régulation de la dynamique transcriptionnelle des gènes ribosomiques. Si certaines des enzymes établissant la méthylation étaient décrites, peu de choses étaient connues sur les KDMs impliquées dans cette dynamique. De plus, jusqu'à ce jour les mécanismes à la jonction entre la chromatine et les voies signalisation qui régulent la transcription des gènes ribosomiques restent mal connus. J'ai ainsi observé que l'histone-demethylase JMJD2A est présente dans les nucléoles de cellules humaines, site de la transcription des gènes ribosomiques. En collaboration avec l'équipe du Dr. Konstantin Panov (Queen's University, Belfast, Irlande), notre objectif a été de comprendre le rôle de JMJD2A dans la transcription des gènes ribosomiques et d'étudier comment cette histone déméthylase intègre les signaux cellulaires qui adaptent cette transcription à la disponibilité en facteurs de croissance (Résultats, partie 1).

Au début de ma thèse, peu de choses étaient connues également sur l'identité des KDMs impliquées dans la déméthylation de H3K4 et H3K9 sur les gènes cibles de E2F, au cours du cycle cellulaire. De plus, les mécanismes moléculaires impliquant des

KDMs dans l'exclusion mutuelle entre les méthylations sur H3K4 et H3K9 étaient à élucider. Mon objectif, sur la base de données de la littérature et de données préliminaires de l'équipe, était de mettre en évidence l'implication de JARID1A/B (H3K4) et de JMJD2A (H3K9) dans la transcription de ces gènes au cours du cycle cellulaire, étudier, leur impact sur la progression dans le cycle et tester leur implication dans l'exclusion mutuelle entre les méthylations sur H3K4 et H3K9. Mes résultats initiaux ajoutés à ceux publiés au cours de ma thèse m'ont amené à me concentrer sur le rôle de KDM5/JARID1A-B dans cette régulation. (Résultats, partie 2).





## Résultats

### **A. Partie1 : L’histone déméthylase JMJD2A et la Régulation transcriptionnelle des gènes ribosomiques en réponse aux facteurs de croissance et aux nutriments**

#### **I. Résultats expérimentaux :**

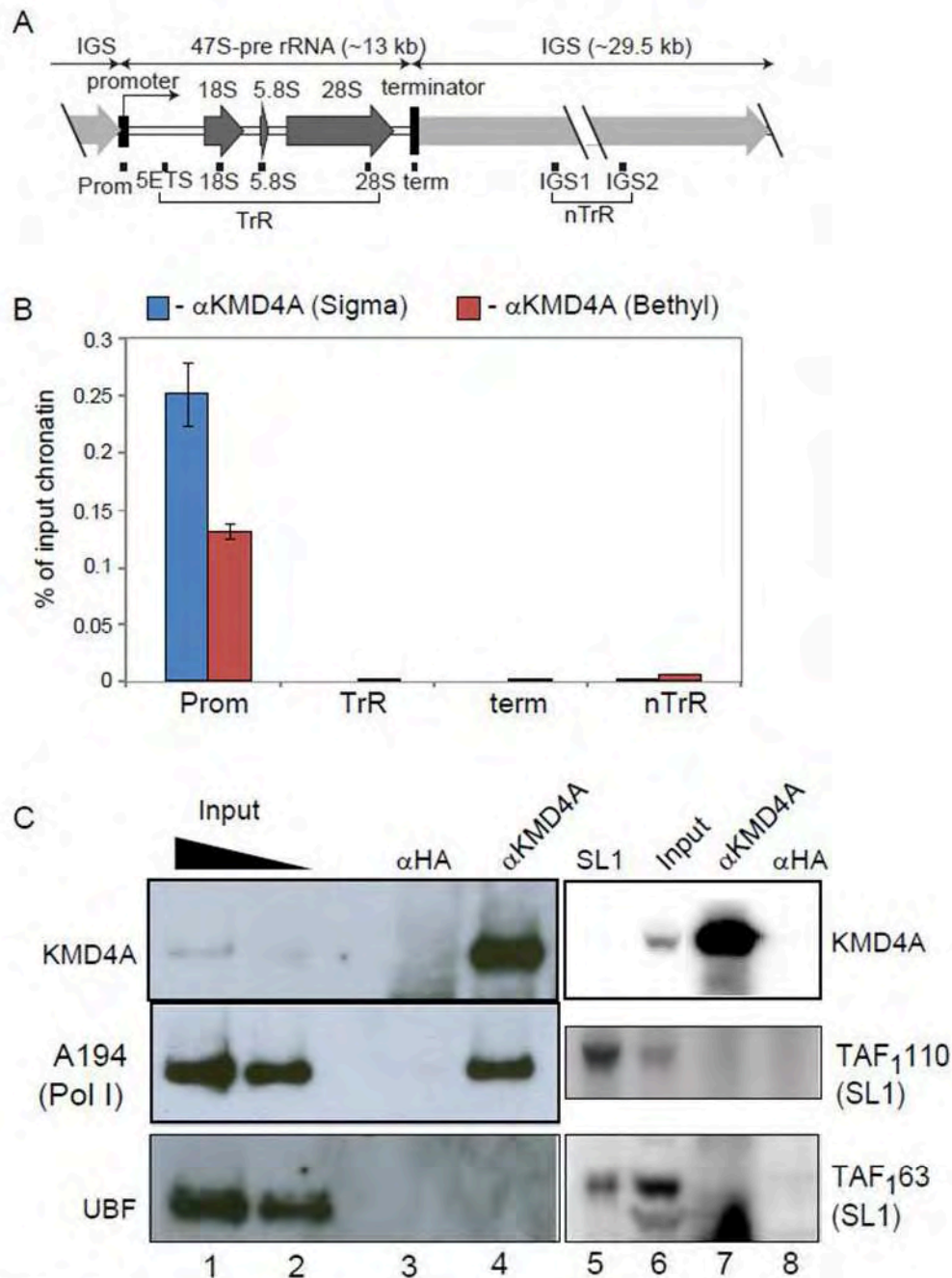
JMJD2A est présente dans les nucléoles et s’associe au ADNr :

Nous avons analysé par immunofluorescence la localisation subcellulaire de JMJD2A dans des cellules U2OS cyclantes. L’analyse par immunofluorescence montre un marquage nucléaire homogène et des zones avec un marquage plus intense qui correspondent aux nucléoles comme l’indique la colocalisation avec la sous unité A194 de l’ARN Pol-I ou avec UBF (**Figure 17A, 17B**). Ces résultats ont été validés dans d’autres lignées cellulaires humaines transformées (HeLa, GC92) ou non transformées (WI38). Le marquage nucléolaire ne semble pas être une propriété commune à toutes les KDMs puisque LSD1 par exemple est exclue des nucléoles (Annexe **figure S1**).

La présence de JMJD2A dans les nucléoles nous a conduit à adresser la question de son recrutement sur les ADNr. Nous avons analysé par immunoprécipitation de chromatine avec deux anticorps différents dans les cellules U2OS cyclantes le recrutement de JMJD2A à différentes régions des ADNr. L’analyse par q-PCR montre un fort enrichissement de JMJD2A au promoteur et un recrutement plus faible dans la région codante ou dans l’IGS (Intergenic spacer) (**figure 18B**).

Nous avons également testé par co-immunoprécipitation si JMJD2A interagit avec la machinerie ARN Pol-I. Pour cela JMJD2A a été immunoprécipitée puis l’immunoprécipitat a été analysé par Western Blot avec des anticorps dirigé contre la sous la sous-unité A194 de l’ARN-Pol-I, les sous unités TAF110 et TAF63 de SL1 et UBF. JMJD2A ne co-précipite pas avec pas avec TAF110, TAF63 ou UBF, par contre elle co-précipite avec A194 suggérant la présence de JMJD2A et de Pol-I dans un même complexe multiprotéique (**figure 18C**).

Ainsi JMJD2A est présente dans les nucléoles, interagit avec l’ARN Pol-I et est recrutée au promoteur des gènes ribosomiques. Nous avons donc étudié son rôle dans la régulation de la transcription des ADNr.



**Figure 18: KDM4A(JMJD2A) s'associe aux ADNr et interagit avec l'ARN Pol-I**

**A:** Schéma d'une copie d'ADNr indiquant les positions des huit couples d'amorces utilisés pour l'analyse par qPCR des ADN immunoprécipités. 5' ETS : external transcribed spacer, IGS : Intergenic spacer

**B:** Des expériences d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP) ont été réalisées avec deux anticorps différents dirigés contre KDM4A(JMJD2A) et analysés par qPCR en utilisant les amorces présentées schéma A. Le bruit de fond correspondant au signal obtenu avec des IgG a été soustrait du signal donné par les anticorps et présenté sous forme de Pourcentage d'Input. Le signal représentant la région transcrite (TrR) correspond à la moyenne des signaux obtenus avec les amorces 5'ETS, 18S, 5.8S et 28S. Le signal représentant la région non transcrite (nTrR) correspond à la moyenne des signaux obtenus avec les amorces IGS1 et IGS2

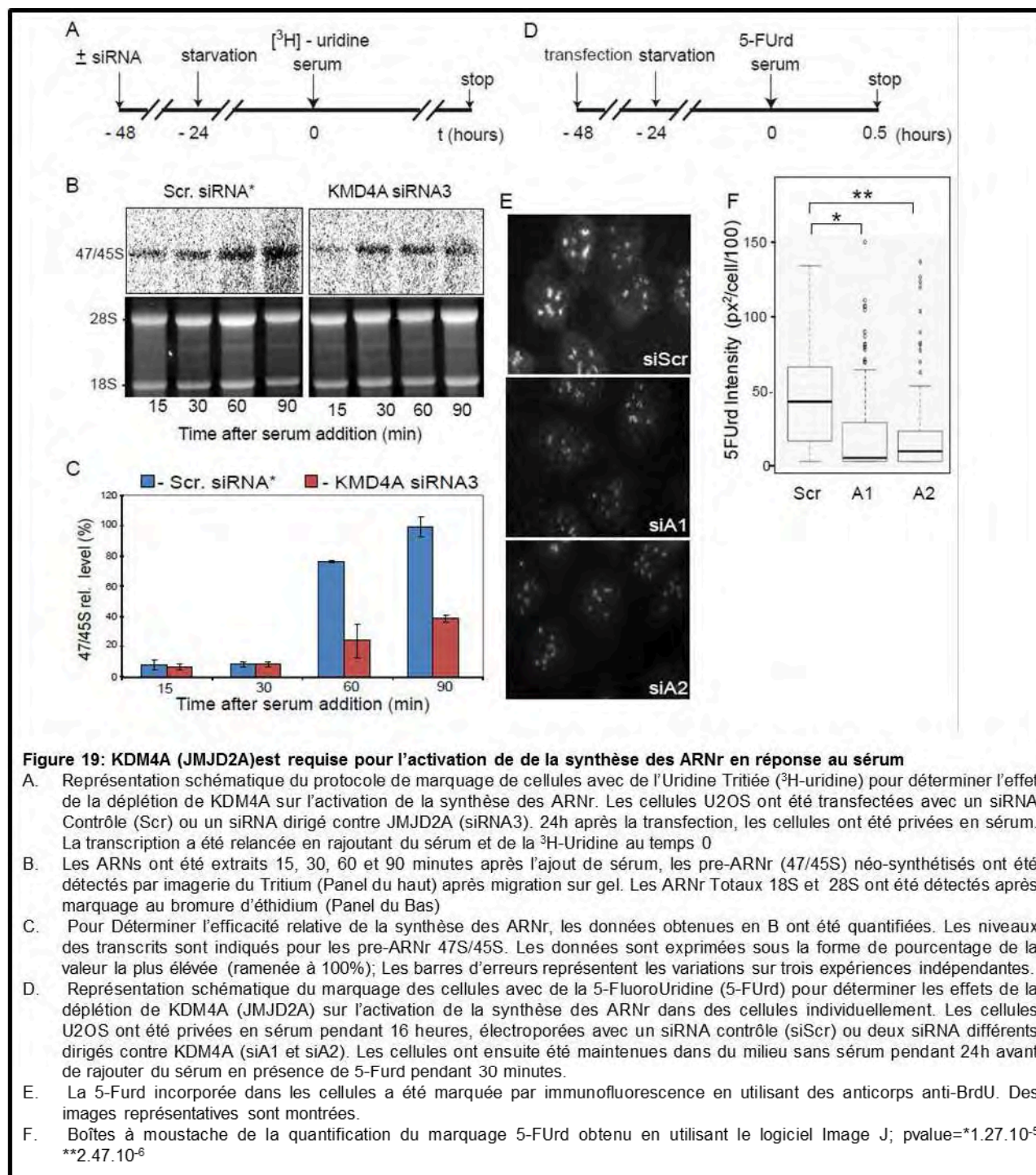
**C:** KDM4A (JMJD2A) a été purifiée à partir d'extraits nucléaires de cellules U2OS en utilisant un anticorps spécifique. Les complexes immunoprécipités ont été analysés par Western Blot avec des anticorps dirigés contre la plus large sous-unité de l'ARN Pol-I A194 et UBF (piste 4), ou contre les sous unités TAF110 et TAF63 (piste 7) de SL1. Inputs Pistes 1,2 et 6, contrôle négatif (anticorps anti-HA) pistes 3 et 8. SL1 purifiée piste 5

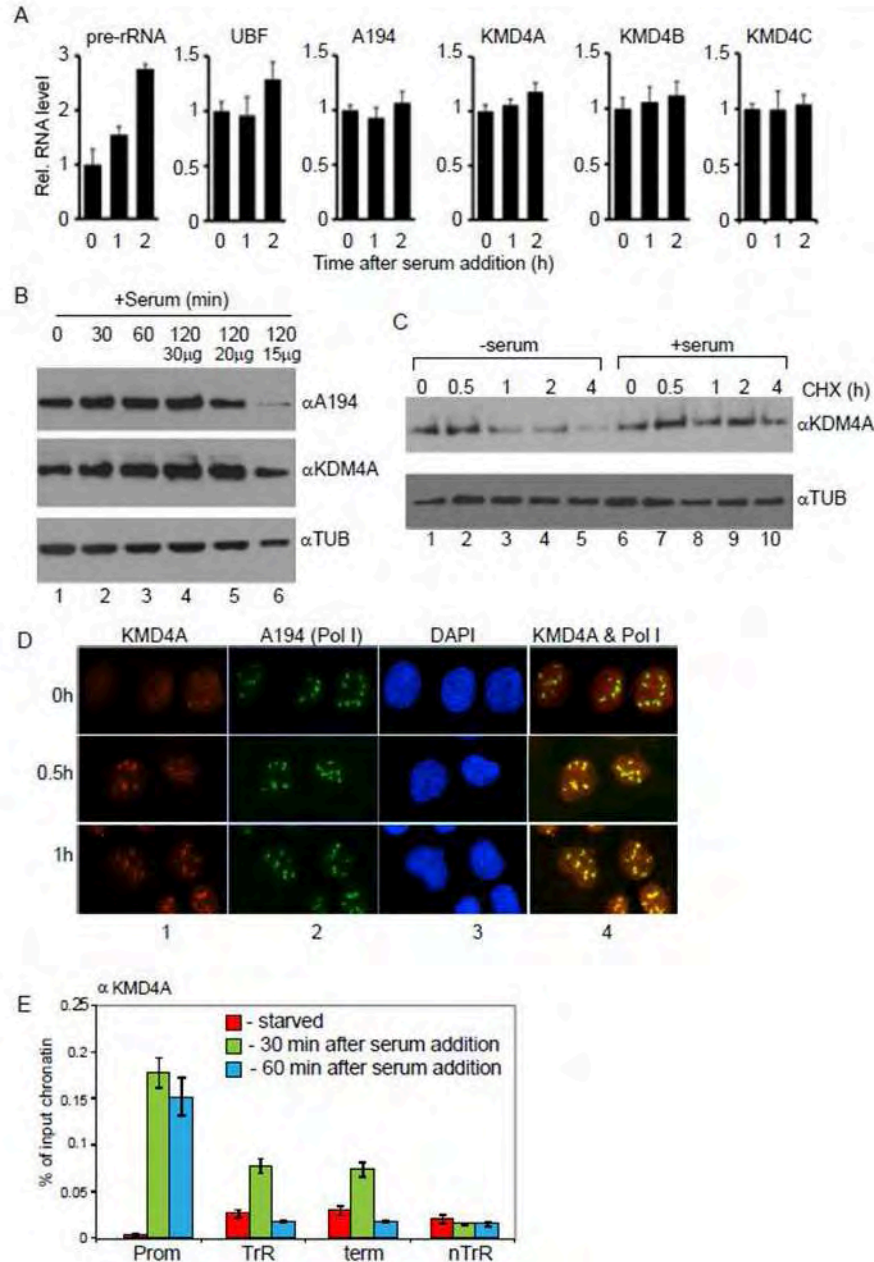
### JMJD2A est requise pour l'activation de la transcription Pol-I en réponse au sérum :

Les facteurs de croissance sont apportés aux cellules en culture par le sérum. La transcription Pol-I étant étroitement régulée en fonction de la disponibilité en facteurs de croissance, elle est réprimée dans les cellules déprivées en sérum et est réactivée lorsque l'on rajoute à nouveau du sérum. Comme décrit plus haut, la chromatine participe à la régulation de la transcription Pol-I. Nous avons donc testé les effets de la déplétion de JMJD2A, histone déméthylase dans la transcription des ADNr en réponse aux facteurs de croissance.

Pour analyser l'activation de la transcription des ADNr en réponse aux facteurs de croissance, les cellules U2OS cyclantes sont déprivées en sérum pendant 24h, à la suite desquelles on rajoute à nouveau du nouveau sérum et on peut ainsi suivre la transcription Pol-I par différentes méthodes. Nous avons mené ce type d'expérience de déprivation-Rajout de sérum en comparant des cellules préalablement transfectées ou non avec un siRNA dirigé contre JMJD2A. La transcription Pol-I a été mesurée en analysant l'incorporation de 5-FUrd (5-fluoridine) que l'on rajoute en même temps que le sérum (**figure 19D**). Le 5-FUrd s'incorpore dans les ARN et est analysé par immunofluorescence en utilisant un anticorps spécifique (anti BrDU). Le marquage nucléolaire reflète la transcription Pol-I. Nous avons pu ainsi observer que l'activation de la transcription Pol-I en réponse au sérum est fortement diminuée dans les cellules déplétées pour JMJD2A en comparaison aux cellules contrôles, indiquant qu'en réponse au sérum, JMJD2A est requise pour activer la transcription Pol-I (**figure 19E,19F**). Nous avons obtenu les mêmes résultats en marquant les ADNr avec de l'Uridine Tritiée (**figure 19B, 19C**).







**Figure 20: Le rajout de sérum après privation des cellules entraîne une re-localisation, une re-association avec les ADN et une augmentation de la stabilité de KDM4A (JMJD2A)**

A. Des cellules U2OS ont été privées en sérum pendant 24 heures (t=0) avant de rajouter du sérum. Les cellules ont été récupérées à 1 heure (t=1) et 2 heures (t=2) après l'ajout de sérum. Les niveaux de pré-ARNr 45S, et des ARNm de UBF, A194 et KDM4A-C ont été analysés aux temps indiqués. Les signaux ont été normalisés par les niveaux d'ARNm du gène de ménage P0.

B. Les cellules U2OS ont été privées en sérum pendant 24 heures (t=0) avant l'ajout de sérum. Les niveaux de KDM4A, A194 et UBF ont été déterminés par western blot aux temps indiqués après l'ajout de sérum, la Tubuline (α-TUB) a été utilisée comme contrôle de charge.

C. Les cellules U2OS ont été privées en sérum pendant 24 heures puis la synthèse protéique a été inhibée avec du cycloheximide (CHX). Les cellules ont été laissées sans sérum (pistes 1-5) ou traitées avec du sérum (pistes 6-10)

Les niveaux de KDM4A et A194 ont été déterminés par western blot à différents temps après traitement au cycloheximide. La Tubuline (α-TUB) a été utilisée comme contrôle de charge

D. Les cellules U2OS ont été privées en sérum pendant 24 heures (t=0) avant de rajouter du sérum. Les cellules ont été fixées 0.5 heure et 1 heure après l'ajout de sérum et analysées par immunofluorescence indirecte avec des anticorps dirigés contre KDM4A (Panel1) et la sous unité A194 de l'ARN Pol-I (Panel2). L'ADN nucléaire a été marqué au DAPI (Panel3). La superposition des images est montrée (Panel4).

E. Des expériences d'immunoprécipitation de chromatine ont été réalisées avec un anticorps dirigé contre KDM4A à partir de chromatine isolée de cellules après privation en sérum (starved) puis 30 min ou 60 min après rajout de sérum et analysées comme décrit en Figure 2B. Les barres d'erreur présentent la variation sur trois expériences indépendantes.

La stabilité de JMJD2A, sa présence dans les nucléoles, et son recrutement sur les ADNr sont régulés par le sérum :

Nous avons en effet étudié dans des expériences de déprivation-rajout de sérum, l'expression de JMJD2A , sa localisation subcellulaire et son recrutement sur les ADNr.

L'Analyse par RT-PCR montre l'augmentation attendue du niveau d'expression des pré-rRNA en réponse au sérum. Cependant on n'observe aucune variation du niveau d'ARNm de JMJD2A. Les niveaux de A194 et d'UBF restent également inchangés (**figure 20A**). L'analyse par Western Blot montre une augmentation du niveau d'expression de JMJD2A lors du rajout de sérum, tandis que les niveaux protéiques de A194 restent inchangés (**figure 20B**). Ces observations suggèrent que l'ajout de sérum régule la stabilité de JMJD2A. Elles sont en

accord avec des données de la littérature qui montrent que l'expression de JMJD2A est régulée par le protéasome. L'ajout de cycloheximide montre que la demi-vie de JMJD2A passe d'environ 1 heure en absence de sérum à 2 heures lors du rajout de sérum (**figure 20C**).

L'analyse par immunofluorescence à différents temps, montre que dans les cellules déprivées en sérum, la localisation de JMJD2A dans les nucléoles est fortement diminuée, pour être rapidement restaurée lorsque l'on rajoute le sérum (**figure 20D**). Ce résultat indique que la capacité de JMJD2A à être localisée au nucléole est régulée par les facteurs de croissance. De fait, l'immunoprécipitation de chromatine montre que le recrutement de JMJD2A sur les ADNr est quasiment perdu dans les cellules déprivées en sérum pour être restauré dès 30min après l'ajout de sérum et reste constant jusqu'à une heure post ajout de sérum (**figure 20E**).

L'ensemble de nos résultats indique donc que la régulation de la localisation de KDM4A est un des mécanismes par lequel la cellule adapte le taux de transcription des rDNAs à la disponibilité en facteurs de croissance.

PI3K régule la localisation nucléolaire de JMJD2A :

Les voies mTOR, ERK et PI3K décrites plus haut étant des voies majeures impliquées dans la régulation de la transcription Pol-I en réponse aux facteurs de croissances et aux nutriments, nous avons testé par immunofluorescence si elles contrôlent la localisation de JMJD2A dans

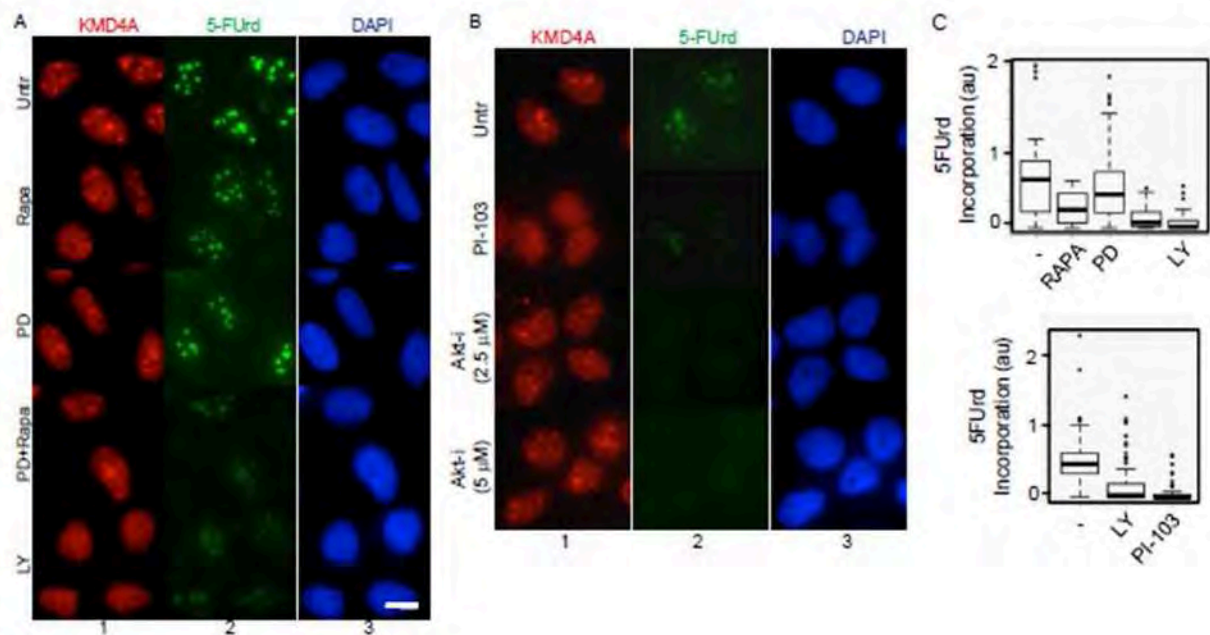
les nucléoles. Pour cela, des cellules U2OS ont été déprivées en sérum, puis traitées avec des inhibiteurs spécifiques de ces kinases avant de rajouter du sérum. L'efficacité des inhibiteurs a été contrôlée en analysant par western blot la phosphorylation de protéines cibles des kinases inhibées (Annexe **figure S4**). La localisation subcellulaire de JMJD2A ainsi que la transcription Pol-I (incorporation de 5-FURD) ont été analysées par immunofluorescence.

En accord avec leur rôle dans la transcription Pol-I, les inhibiteurs de chacune des trois kinases entraînent une diminution de la transcription Pol-I, avec un effet plus important lorsque l'on inhibe PI3K. Les inhibiteurs de MEK/MAPKK(PD98059) ou de mTOR (Rapamycine) n'ont pas d'effet sur la localisation de JMJD2A.

Cependant, les inhibiteurs de PI3K (LY294002 et PI-103) inhibent la translocation de JMJD2A dans les nucléoles (**figure 21A, 21C**). Pour s'assurer que l'effet des inhibiteurs de PI3K sur la translocation nucléolaire de JMJD2A n'est pas dû à l'inhibition plus forte observée sur la transcription Pol-I, les inhibiteurs des voies MAPK et mTOR ont été combinés. En accord avec les données de la littérature qui suggèrent une coopération entre ces deux voies dans l'activation de la transcription Pol-I, ce traitement inhibe la transcription Pol-I à un niveau comparable à celui observé pour l'inhibiteur de PI3K, mais pourtant n'affecte pas la translocation de JMJD2A dans les nucléoles (**figure 21A, 21C**). Ces observations montrent d'une part que PI3K régule translocation de JMJD2A dans les nucléoles en réponse au sérum et d'autre part que cette translocation n'est pas une conséquence de l'activation de la transcription Pol-I.

L'effet de PI3K sur la translocation de JMJD2A est indépendant de AKT, effecteur majeur décrit pour PI3K. En effet le traitement avec des inhibiteurs de AKT, n'affecte pas la translocation de JMJD2A dans le nucléole (**figure 21B**). Le mécanisme par lequel PI3K, indépendamment de AKT, régule JMJD2A reste à élucider.





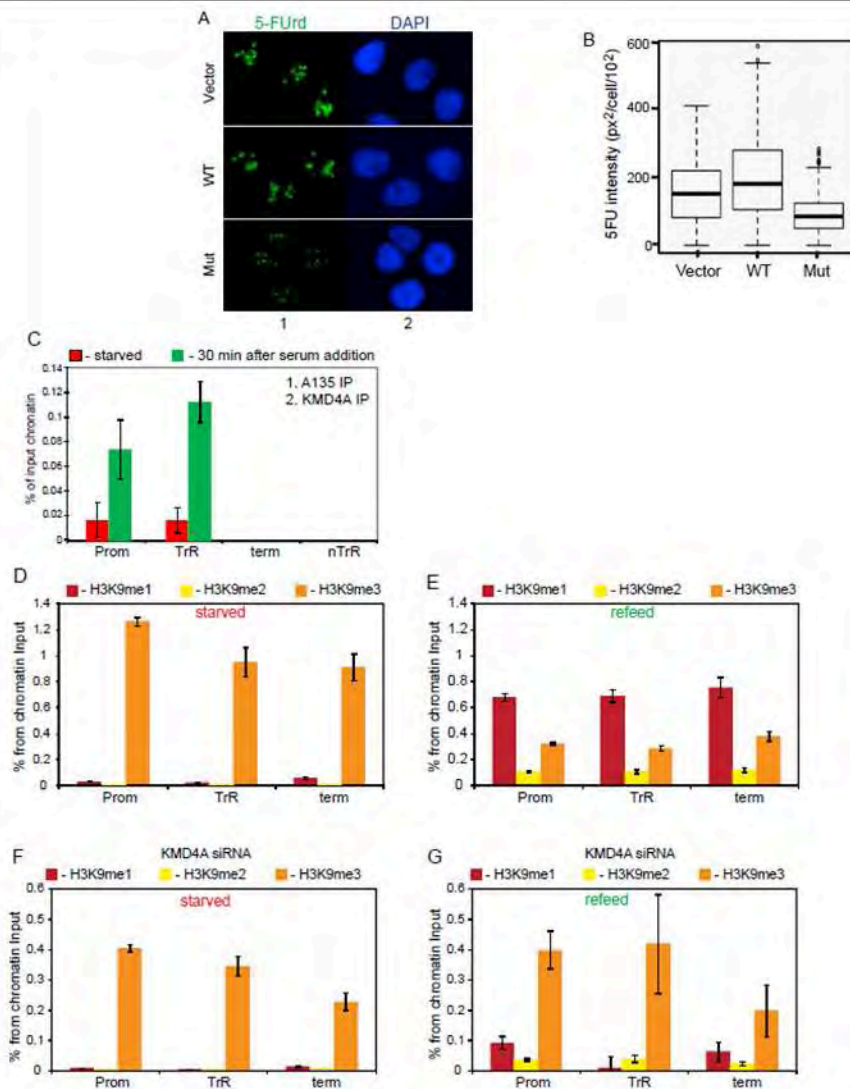
**Figure 21 : La voie PI3K contrôle la localisation nucléaire de JMJD2A**

- A. Des cellules U2OS ont été privées en sérum pendant 24 heures avant de rajouter du sérum en même temps que de la 5-Furd. Après l'ajout de sérum, les inhibiteurs de MAPK PD98059 (PD), de mTOR rapamycine (Rapa), ou de PI3K LY294002 (LY) ou un mélange des inhibiteurs de mTOR et de MAPK (PD+Rapa) ont été ajoutés. Les cellules contrôle ont été laissées sans traitement (Untr). 30 minutes après l'ajout de sérum, les cellules ont été fixées et analysées par immunofluorescence en utilisant des anticorps dirigés contre KDM4A (Panel 1) ou la 5-Furd (Panel 2); L'ADN nucléaire a été marqué au DAPI
- B. Les cellules U2Os ont été privées en sérum pendant 24 heures avant de rajouter du sérum en même temps que de la 5-Furd. Après l'ajout de sérum, l'inhibiteur de PI3K PI-103 et deux concentration de l'inhibiteur de AKT AKT VIII (AKT-i) ont été ajoutés. Les cellules contrôle ont été laissées sans traitement (-). 30 minutes après l'ajout de sérum, les cellules ont été fixées et analysées par immunofluorescence indirecte en utilisant des anticorps dirigés contre KDM4A (Panel 1) et le 5-Furd (Panel2). L'ADN nucléaire a été marqué au DAPI (Panel 3).
- C. Quantification du marquage 5-Furd de la figure 5A (Dessus) et de la figure 5B (Dessous), comme en figure 3F. Aucune incorporation de 5-Furd n'a pu être mesurée lors de l'inhibition de AKT.

### L'activation de la transcription Pol-I par JMJD2A s'accompagne de la déméthylation de H3K9me3 :

Nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires par lesquels JMJD2A régule la transcription Pol-I en réponse au sérum. Dans un premier temps nous avons testé si son activité enzymatique est requise pour activer la transcription Pol-I en réponse au sérum. Pour cela une forme active ou un mutant de l'activité catalytique (JMJD2A<sup>H188A</sup>) ont été surexprimés dans les cellules U2OS préalablement à une expérience de déprivation-rajout de sérum. L'effet de la surexpression du mutant sur la transcription Pol-I a été mesuré par immunofluorescence après incorporation de 5-FURD. Le niveau de transcription Pol-I dans les cellules surexprimant JMJD2A<sup>H188A</sup> est plus faible en réponse au sérum que dans les cellules exprimant la protéine sauvage, indiquant que l'activité déméthylase de JMJD2A est requise pour l'activation de la transcription Pol-I en réponse au sérum (**figure 22A, 22B**) .

Nous avons ensuite étudié par immunoprécipitation de chromatine les effets de la déplétion de JMJD2A sur la méthylation au niveau des ADNr de H3K9 substrat de JMJD2A. Comme décrit plus haut (rubrique organisation des ADNr), 50% des copies des ADNr sont maintenues en permanence dans un état « silencé » hétérochromatinisé et réfractaire à la transcription. Seuls les 50% restant peuvent être mobilisés pour la transcription Pol-I.



**Figure 22: Le rajout de sérum après privation entraîne la déméthylation KDM4A (JMJD2A) dépendante de résidus cibles sur les histones**

- A. L'activité de KDM4A est requise pour l'activation de la synthèse des ARNr en réponse au sérum. Des cellules U2OS ont été électroporées avec un vecteur qui code pour une forme sauvage (wt), un mutant catalytiquement inactif de KDM4A (mut) ou un vecteur vide (Vector). Les cellules ont été cultivées pendant 24 heures puis privées en sérum pendant 24 heures, avant de rajouter du sérum en présence de 5 Furd. 30 minutes après l'ajout de sérum, les cellules ont été analysées par immunofluorescence avec un anticorps dirigé contre la 5-Furd (panel1), L'ADN nucléaire a été marqué au Dapi (Panel2)
- B. Quantification du signal en 5-Furd comme en figure 3F
- C. La chromatine a été isolée à partir de cellules après privation en sérum puis rajout de sérum (30 minutes après l'ajout de sérum). Cette chromatine a été soumise à une première immunoprécipitation avec un anticorps dirigé contre la sous unité A135 de l'ARN Pol-I. Après élution, la chromatine immunoprécipitée a été soumise à une seconde immunoprécipitation avec un anticorps dirigé contre KDM4A (JMJD2A). L'analyse a été faite comme en figure 2B. Les signaux ont été normalisés par les signaux obtenus pour les Immunoprécipitation contrôle avec les IgG. Les barres d'erreurs représentent les variations sur trois expériences indépendantes.
- D. E La chromatine a été isolée à partir de cellules après privation en sérum (starved) (D) et après privation puis rajout de puis rajout de sérum (refeed) (1 heure après l'ajout de sérum) (E). Les mêmes quantités de chromatine ont été soumises à une première immunoprécipitation avec un anticorps dirigé contre la sous unité A135 de l'ARN Pol-I. Après élution, la chromatine immunoprécipitée a été soumise à une seconde immunoprécipitation avec des anticorps dirigés contre H3, H3K9me1 et H3K9me3 puis analysée par qPCR en utilisant 8 jeux d'amorces qui amplifient différentes régions des ADNr. Les signaux ont été normalisés par les signaux obtenus pour les Immunoprécipitation contrôle avec les IgG et avec les signaux H3, puis exprimés sous forme de pourcentage de l'input et analysés comme en figure 2B. Les barres d'erreurs représentent les variations sur trois expériences indépendantes.
- F.G Les cellules U2OS ont été transfectées avec un siRNA dirigé contre KDM4A (siRNA3). 24heures après la transfection les cellules ont été privées de sérum pendant 24 heures. La chromatine a ensuite été E La chromatine a été isolée à partir de cellules après privation en sérum (F) et après privation puis rajout de puis rajout de sérum (1 heure après l'ajout de sérum) (G). La chromatine a ensuite été analysée comme en D et E.

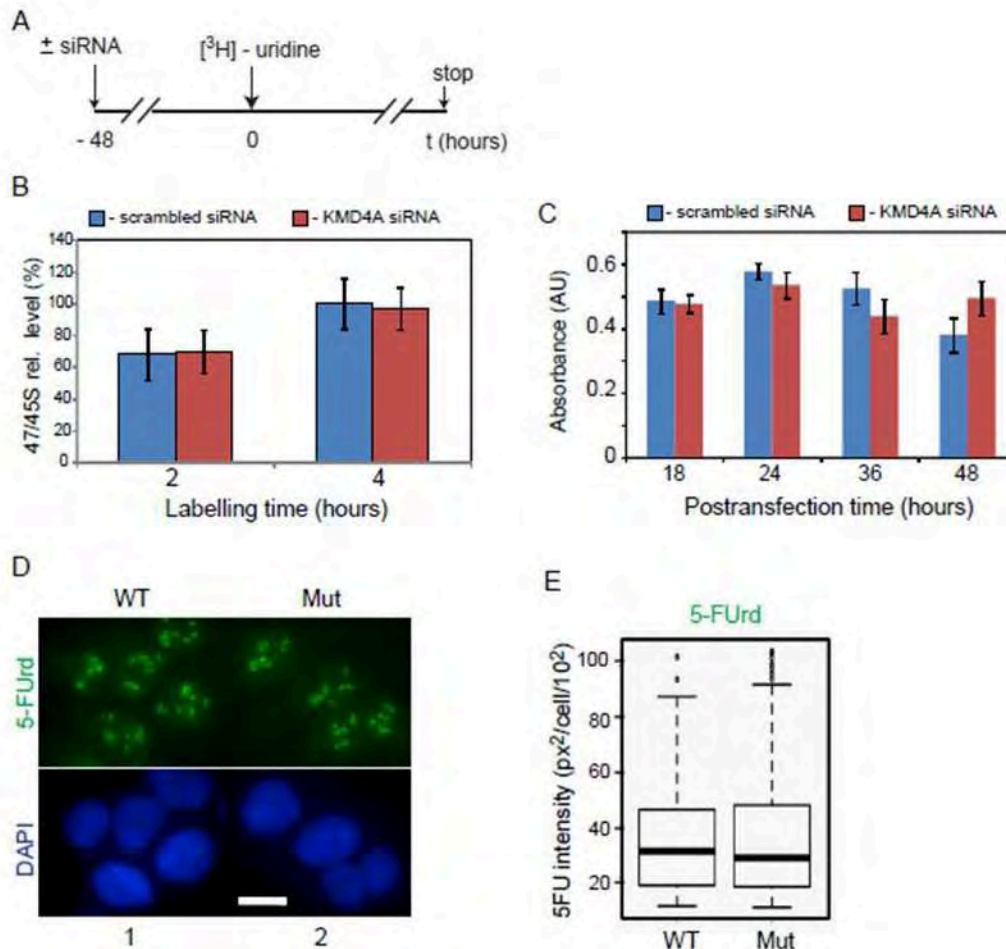
Nous avons tiré profit du fait que même dans les cellules U2OS déprivées en sérum, une fraction de l'ARN Pol-I reste liée sur les ADNr (Ray *et al*, 2013). Ainsi, en immunoprécipitant l'ARN Pol-I on isole les ADNr euchromatiniens aussi bien actifs que réprimés. On s'affranchit ainsi des copies « silencées » des ADNr qui sont caractérisées par l'absence d'ARN Pol-I. Les ADNr euchromatiniens ainsi isolés peuvent ensuite être soumis à une seconde immunoprécipitation avec un anticorps dirigé contre la cible de notre choix.

Nous avons par cette technique de ChIP-reChIP confirmé dans un premier temps que JMJD2A se lie aux copies euchromatiniennes des ADNr (**figure 22C**). Ensuite nous avons étudié l'effet de la déplétion de JMJD2A sur les méthylations H3K9 et H3K36 dans des expériences déprivation-rajout de sérum. Pour cela nous avons utilisé pour la seconde immunoprécipitation des anticorps dirigés contre H3K9me3, H3K9me2, H3K9me1 et H3K36me3. Des anticorps dirigés contre les IgG ont été utilisés pour déterminer le bruit de fond qui a été soustrait du signal obtenu avec les anticorps. Nous avons pu obtenir des signaux interprétables (supérieurs au bruit de fond) avec les anticorps dirigés contre H3K9me3, et H3K9me1. Ces signaux ont été normalisés par le signal obtenu avec un anticorps dirigé contre H3.

Comme attendu, dans les cellules traitées avec le siRNA contrôle, en corrélation avec l'activation de la transcription Pol-I, on observe lors de l'ajout de sérum une diminution de la forme triméthylée H3K9me3 au profit de H3K9me1 qui traduit une déméthylation de la marque répressive H3K9me3 (**figure 22D, 22E**). Cette déméthylation de H3K9me3 en réponse au sérum est perdue dans les cellules déplétées pour JMJD2A (**figure 22F, 22G**). Ce résultat suggère que JMJD2A déméthyle H3K9me3 sur les copies euchromatiniennes des rDNA lors de l'ajout de sérum et que cette déméthylation joue un rôle important dans l'activation de la transcription Pol-I en réponse au sérum.

JMJD2A n'est pas indispensable pour maintenir la transcription Pol-I dans les cellules non déprivées en sérum :

JMJD2A étant présente sur les ADNr dans les cellules cyclantes non déprivées en sérum, nous avons étudié son rôle dans la transcription Pol-I dans des cellules U2OS prolifératives. La déplétion de JMJD2A dans les cellules prolifératives n'a pas d'effet sur la transcription Pol-I mesurée en quantifiant l'incorporation d'Uridine tritiée dans les pre-ARNr (**figure 23A, 23B**). De même en surexprimant le mutant JMJD2A<sup>H188A</sup> catalytiquement inactif, nous n'observons



**Figure 23: KDM4A (JMJD2A) n'est pas essentielle pour le maintien de la transcription Pol-I et la croissance des cellules cyclantes**

A. Représentation schématique du marquage des cellules avec de l'Uridine tritiée (<sup>3</sup>H-Uridine) pour déterminer les effets de la déplétion de KDM4A (JMJD2A) sur la transcription des ADNr dans les cellules prolifératives.

B. Les efficacités relatives de la synthèse des ARNr ont été quantifiées et les niveaux des transcrits sont indiqués pour les pre-ARNr 47S/45S. Les données sont exprimées sous forme de pourcentage de la plus haute valeur (ramenée à 100%). Les barres d'erreurs représentent les variations sur 3 expériences indépendantes.

C. La croissance cellulaire a été mesurée par MTT assay (cf annexe matériel et méthode). Les barres d'erreurs représentent les variations sur 3 expériences indépendantes.

D. Des cellules U2OS prolifératives (70% confluence) ont été électroporées avec un vecteur qui code pour une forme sauvage (wt), un mutant catalytiquement inactif de KDM4A (mut) ou un vecteur vide (Vector). Après 48 heures les cellules sont traitées avec de la 5-FUrd (30 minutes) et analysées par immunofluorescence avec des anticorps dirigés contre la 5-FUrd (anticorps anti-BrdU). L'ADN nucléaire a été marqué au DAPI.

E. Boîtes à moustache de la quantification du marquage 5-FUrd obtenu, en utilisant le logiciel Image J; ttest pvalue>0.05, indiquant qu'il n'y a pas de différence significative du marquage 5-FUrd lors de la surexpression de forme sauvage (wt) ou mutée (mut) de KDM4A.



pas d'effet sur la transcription Pol-I mesurée par immunofluorescence après incorporation de 5-FURD (**figure 23C, 23E**). La capacité des cellules à proliférer a été mesurée par un test de survie et ne montre aucun effet de la déplétion de JMJD2A. Ces résultats indiquent que même si elle est présente au promoteur des rDNA dans les cellules prolifératives, JMJD2A n'est pas requise pour maintenir la transcription Pol-I.

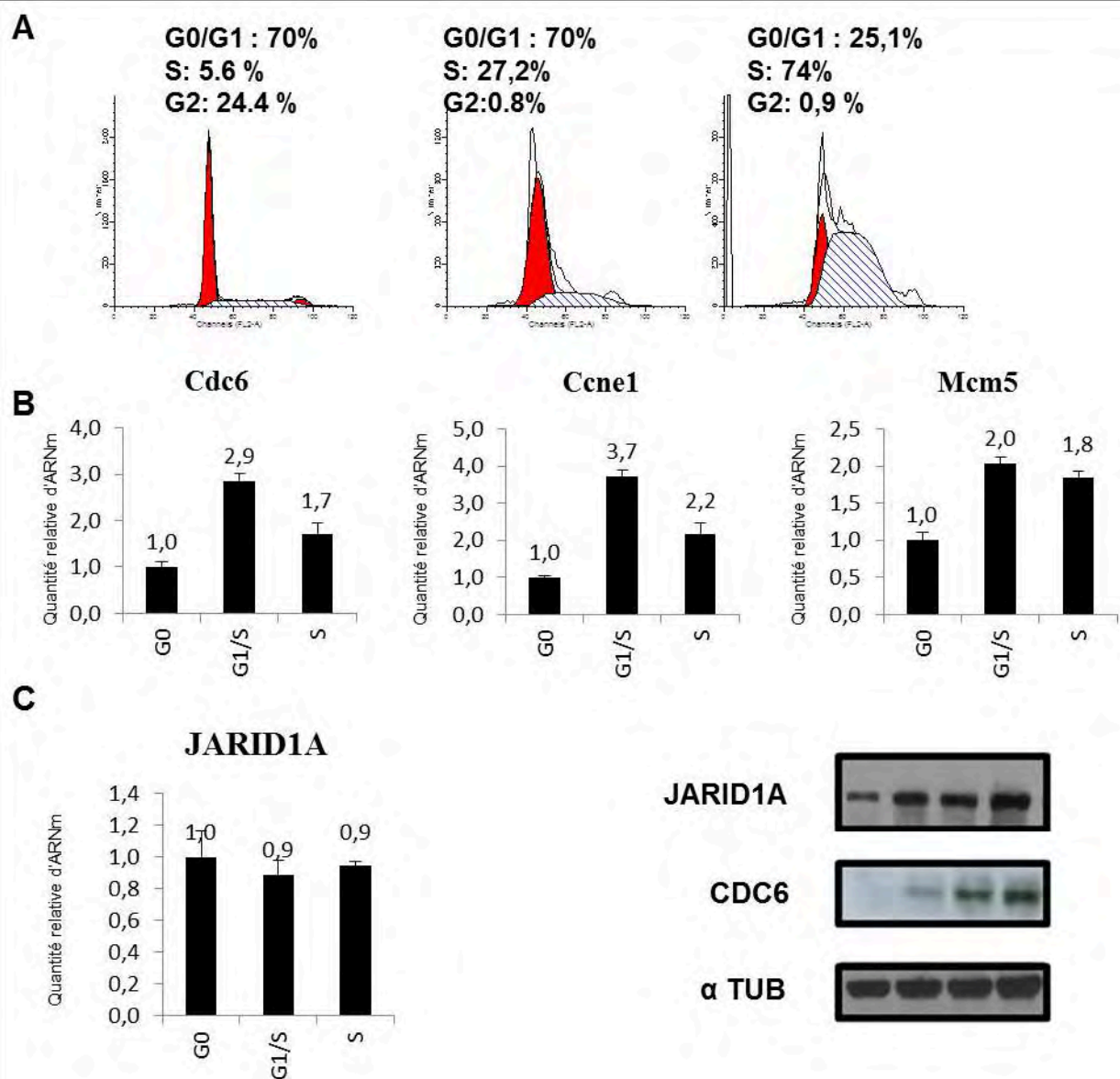
## II. Conclusions :

Dans ce premier axe de ma thèse, nous avons observé que JMJD2A est présente dans les nucléoles des cellules humaines et avons montré son implication dans la régulation de la transcription Pol-I. JMJD2A participe à l'activation de la transcription Pol-I en réponse aux facteurs de croissance. En effet, dans les cellules privées en sérum où la transcription Pol-I est réprimée, JMJD2A est délocalisée des nucléoles. En réponse au sérum, elle s'accumule dans les nucléoles où elle est requise pour l'activation subséquente de la transcription Pol-I. Nous avons montré que l'accumulation nucléolaire de JMJD2A en réponse au sérum est régulée par une voie Phosphatidyl-inositol-3-Kinase (PI3K) indépendante de AKT. Son rôle dans l'activation de la transcription Pol-I est dépendant de son activité. Ainsi, JMJD2A intervient dans la déméthylation de H3K9me3 au promoteur des ADNr, événement nécessaire à leur activation transcriptionnelle en réponse au sérum.

Les données de la littérature démontrent l'implication de plusieurs voies signalétiques (PI3K, MAPK, mTOR) dans la régulation de la transcription des ADNr par Pol-I. Ces voies ciblent les facteurs généraux de la transcription comme UBF, ou RRN3 (TIF-1A), permettant une adaptation de la transcription Pol-I en réponse aux facteurs de croissance. Certains des mécanismes affectant la structure de la chromatine et les acteurs impliqués dans ce remodelage au niveau des gènes ribosomiques sont également bien décrits. En revanche, peu de choses sont connues sur les mécanismes à l'intersection entre les voies de transduction du signal et la chromatine dans ce processus, encore moins au regard des histone-déméthylases.

Nos résultats montrent pour la première fois l'implication de l'histone déméthylase JMJD2A dans la régulation de la transcription Pol-I. Ils placent cette histone- déméthylase à la jonction entre la chromatine et une voie de signalisation régulée par PI3K, mais indépendante de Akt dans la régulation de la transcription Pol-I, première étape de la

biogénèse des ribosomes. Les mécanismes par lesquels la PI3K régule la localisation subcellulaire de JMJD2A sont encore à l'étude (voir discussion).



**Figure 24: L'expression de JARID1A augmente lors de la progression en G1**

Des cellules NIH3T3 ont été synchronisées en G0 par privation en sérum pendant 48h. Les cellules sont ensuite relancées dans le cycle en rajoutant du sérum

**A/** Analyse par cytométrie en flux . Les cellules sont soumises à un pulse de BrdU pendant 30 minutes puis fixées au temps indiqués. Les graphes présentés montrent l'incorporation d'iodure de propidium, La répartition des cellules dans le cycle présentée au dessus des graphes est déterminée après co-marquage avec l'iodure de propidium et le BrdU. Après déprivation de sérum les cellules sont en G0. Elles sont en G1/S 10h après ajout de sérum et en phase S 12h après.

**B/** Les cellules sont analysées par RT-qPCR à 0 -10h (G1/S) ou 12h (S) après ajout de sérum. Les niveaux d'ARNm des gènes cibles de E2F *Cdc6*, *Ccne1* et *Mcm5* sont quantifiés, et normalisés par la  $\beta 2M$ .

**C/** Niveaux d'expression de JARID1A mesurés par RT-PCR (panel de gauche) et par western Blot (Panel de droite)

Les quantifications par qPCR sont faites en triplicats. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type sur les triplicats de qPCR

**Est présentée une expérience représentative, Ces résultats ont été observés dans 3 expériences indépendantes**



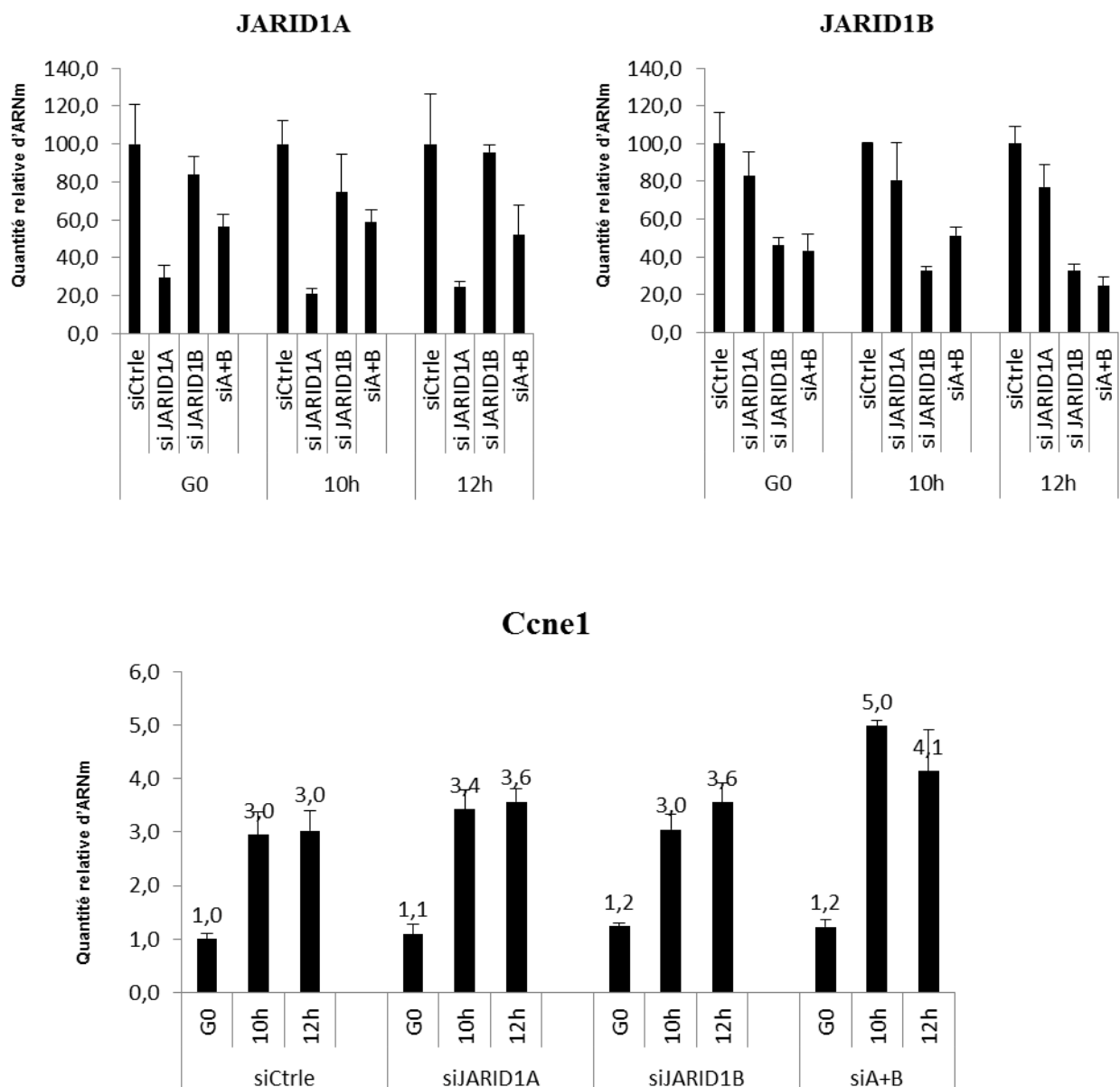
## **B. Partie 2 : Les histones déméthylases JARID1A/KDM5A et JARID1B/KDM5B dans la régulation transcriptionnelle des gènes cibles de E2F**

Résultats expérimentaux :

### L'expression de JARID1A augmente lors de la progression des cellules en G1 :

J'ai dans un premier temps étudié le niveau d'expression de JARID1A et JARID1B au cours du cycle cellulaire, afin de rechercher une éventuelle corrélation entre leur expression et celle des gènes cibles de E2F. Des cellules NIH3T3 ont été synchronisées en G0 par privation de sérum pendant 48h puis relancées dans le cycle par ajout de sérum. L'analyse de la distribution des cellules dans le cycle par cytométrie en flux indique qu'elles entrent en phase S entre 10 et 12 heures après le rajout de sérum (**figure 24A**). Par RT-PCR, on observe, comme attendu, que l'expression des gènes cibles de E2F *Cdc6*, *Ccne1* et *Cdc25a* augmente à la transition G1/S (**figure 24B**).

Aucune variation significative de l'expression de JARID1A au niveau des ARNm n'est observable lors de la progression en G1 (**figure 24C**). Cependant, par Western blot on observe que le niveau protéique de JARID1A augmente lors de la progression en phase S, avec un profil similaire à celui de *Cdc6* gène cible de E2F (figure 24C). Ces résultats indiquent que le niveau d'expression de JARID1A est régulé au niveau post-transcriptionnel au cours de la progression depuis la quiescence jusqu'à la phase S. L'augmentation de son expression lors de la progression vers la phase S en corrélation avec l'activation des gènes cibles de E2F suggère qu'elle peut jouer un rôle dans la régulation transcriptionnelle de ceux-ci lorsqu'ils sont activés.



**Figure 25: La co-déplétion de JARID1A et JARID1B augmente la transcription de Ccne1**

Des cellules NIH3T3 ont été synchronisées en G0 puis traitées avec des siRNA Contrôle (siCtrl) ou dirigés contre JARID1A, JARID1B ou les deux (siA+B) avant d'être relancées dans le cycle. Les cellules sont analysées par RT-PCR à 0h (G0) 10h (transition G1/S) et 12h (phase S) après ajout de sérum.

A/ L'efficacité des siRNA contre JARID1A et JARID1B a été testée par RT-PCR. Les niveaux d'ARNm de JARID1A et JARID1B sont quantifiés et normalisés par la  $\beta$ -2 microglobuline ( $\beta$ 2M). Ils sont présentés sous forme de pourcentage du niveau dans les cellules Contrôle (ramené à 100%)

B/ Profil d'expression de *Ccne1*, gène cible de E2F analysé en RT-PCR à 0 (G0) 10h (transition G1/S et 12h (phase S) après ajout de sérum. Le niveau d'ARNm de *Ccne1* est normalisé par ( $\beta$ 2M). Les niveaux d'ARNm sont divisés par celui des cellules en G0 traitées avec le siCtrl (ramené à 1).

Les quantifications par qPCR sont faites en triplicats. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type sur les triplicats de qPCR

**Cette expérience a été réalisée une fois, par la suite nous avons co-déplété JARID1A et JARID1B**

### JARID1A et JARID1B répriment l'expression de la Cycline E (*Ccne1*) gène cible de E2F à la transition G1/S et en phase S :

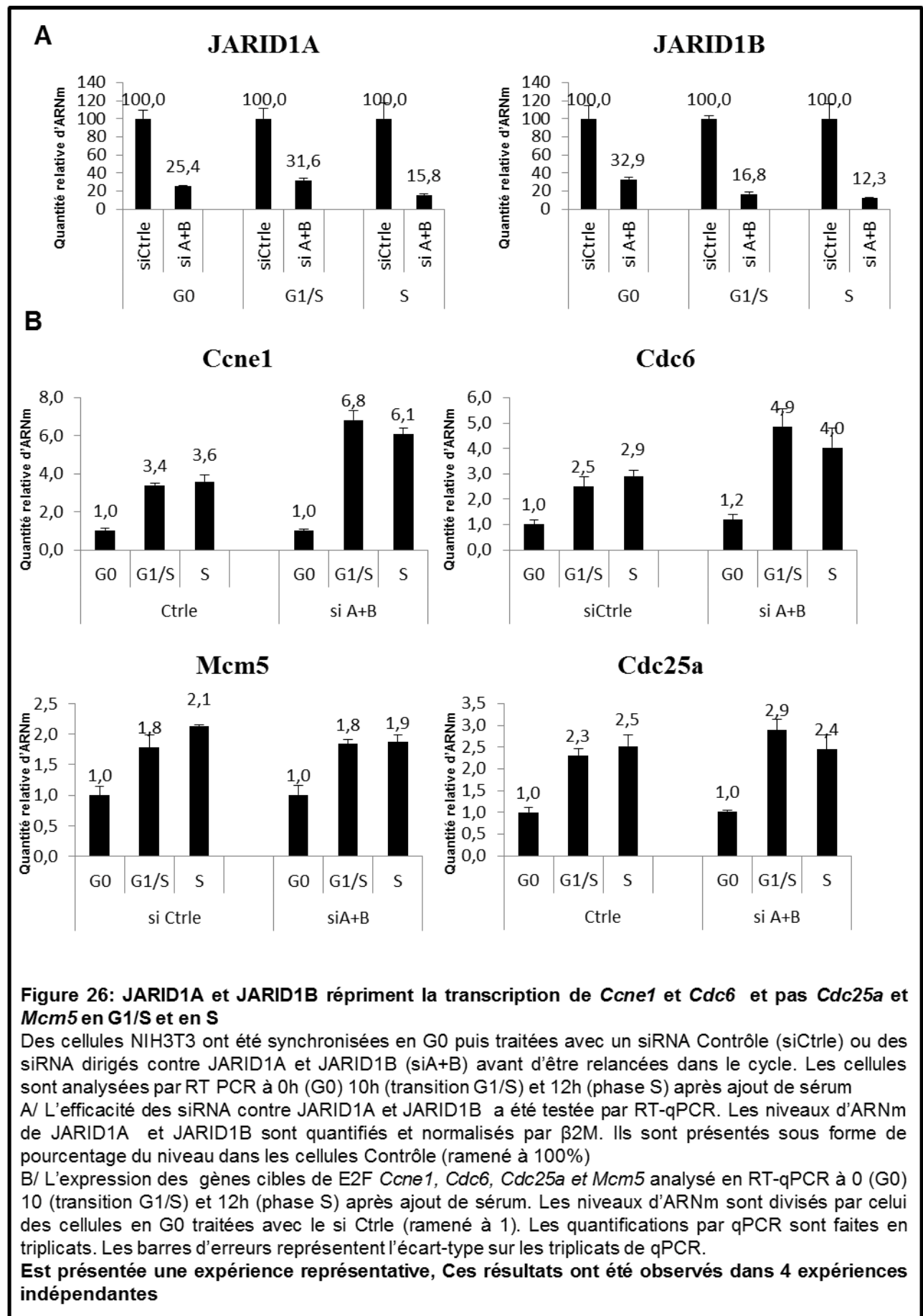
Pour étudier le rôle de JARID1A dans l'expression des gènes cibles de E2F au cours du cycle cellulaire, nous avons utilisé une approche perte de fonction dans les cellules NIH3T3 synchronisées. Les cellules sont synchronisées en G0 par privation de sérum, puis transfectées avec des siRNA en l'absence de sérum. Après la transfection lorsque l'action des siRNA est effective, les cellules sont relancées dans le cycle en rajoutant du sérum.

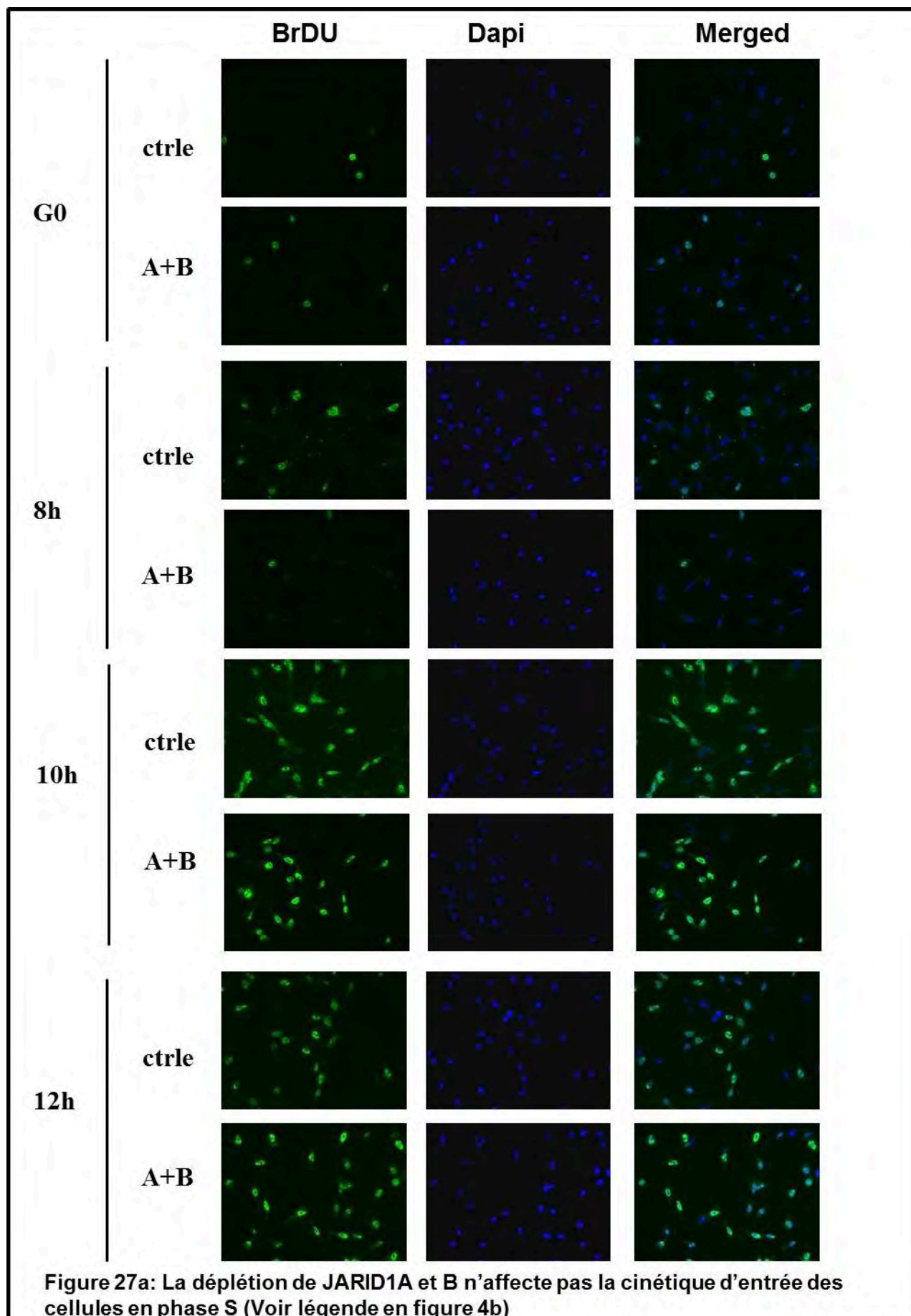
Comme évoqué dans la rubrique « famille JARID1 et régulation transcriptionnelle », il a été décrit que l'absence de JARID1A sur certains gènes cibles pouvait être compensée par JARID1B. Dans une première expérience, nous avons testé par RT-PCR les effets de la déplétion de JARID1A et JARID1B séparément et de leur co-déplétion sur la transcription des gènes cibles de E2F. L'efficacité des siRNA sur leurs cibles a été testée par RT-PCR (**figure 25A**). Nous n'observons par RT-PCR aucun effet de la déplétion de JARID1A ou JARID1B sur la transcription de *Ccne1* gène cible de E2F. Cependant la co-déplétion de JARID1A et JARID1B entraîne une augmentation de la transcription de *Ccne1* en G1/S et en S (**figure 25B**). Par la suite, nous avons co-déplété JARID1A et JARID1B (**figure 26A**). J'ai ainsi observé par 4 expériences indépendantes que la co-déplétion de JARID1A et B conduit à une augmentation significative de la transcription de *Ccne1* et *Cdc6*, à la transition G1/S et en phase S, c'est à dire lorsque celle-ci est activée. Les gènes cibles de E2F *Cdc2a* et *Mcm5* ne montrent pas de variation significative après déplétion de JARID1A et JARID1B (**figure 26B**).

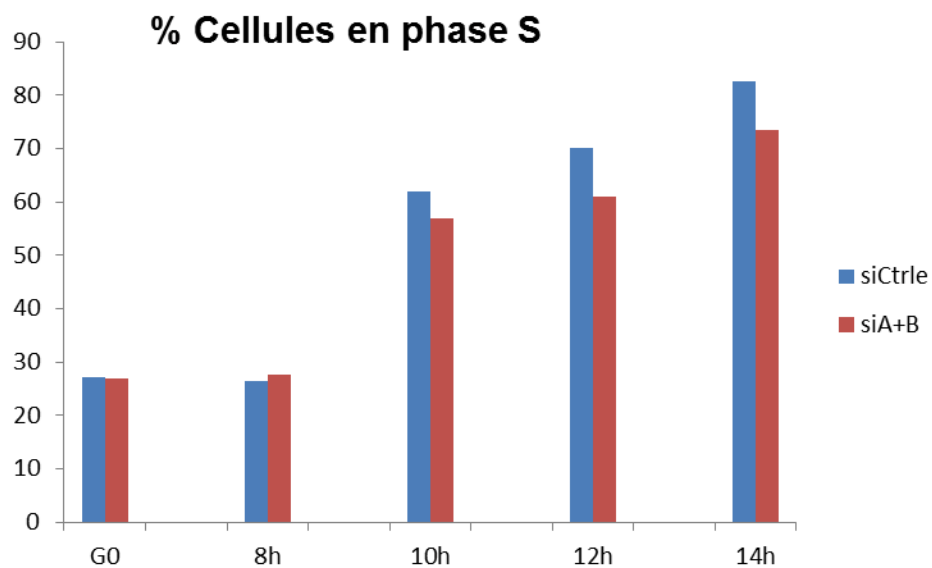
Ces expériences montrent que JARID1A et JARID1B sont requises en G1/S et en S pour limiter la transcription de *Ccne1*, et *Cdc6* tandis que certains gènes comme *cdc25a* et *Mcm5* ne sont pas régulés. Les raisons de cette spécificité pour certains gènes de E2F cibles restent à déterminer.

### La déplétion de JARID1A et JARID1B n'affecte pas l'entrée des cellules en phase S :

Ayant observé une augmentation de la transcription de *Cdc6* et *Ccne1*, gènes cibles de E2F impliqués dans l'entrée et la progression en phase S, nous avons voulu tester si les cellules déplétées pour JARID1A/B avaient une cinétique d'entrée en phase S accélérée. Nous avons donc déplété des cellules NIH3T3 en G0 pour JARID1A et B à l'aide de siRNAs







**Figure 27b: La déplétion de JARID1A et JARID1B n'affecte pas la cinétique d'entrée des cellules en phase S**

Des cellules NIH3T3 ont été synchronisées en G0 puis traitées avec des siRNA Ctrlle ou dirigés contre JARID1A et B avant d'être relancées dans le cycle, les cellules sont traitées pendant 30 minutes avec du BrDU puis fixées au temps indiqués. Les cellules BrDU positives sont ensuite marquées en immunofluorescence en utilisant un anticorps dirigé contre le BrDU.

A/ Analyse en immunofluorescence du marquage BrDU (Panel de gauche). Les noyaux sont marqués au dapi (pane du centre). La superposition des deux images est présentée (Panel de droite)

B/ Quantification du pourcentage de cellules BrDU positives. Au moins 300 cellules sont comptées par condition.

**Est présentée une expérience représentative, ces résultats ont été observés dans 3 expériences indépendantes**

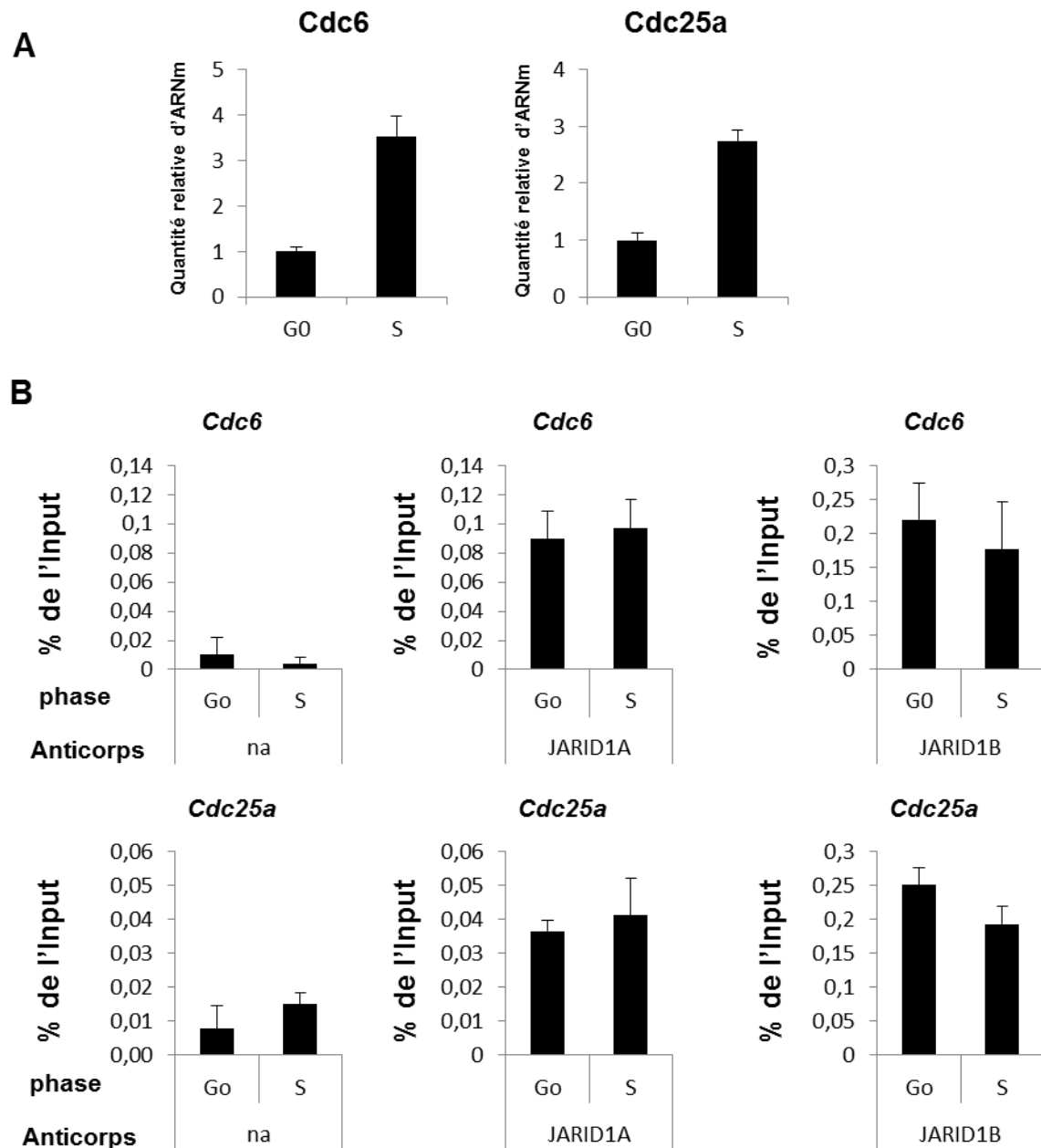
comme décrit plus haut, et nous les avons stimulées au sérum. L'entrée des cellules en phase S a été mesurée par immunofluorescence (**figure 27A, 27B**). Pour cela, à différents temps après ajout de sérum, les cellules ont été traitées pendant 30 minutes avec du BrDU qui est incorporé uniquement par les cellules en phase S. Les cellules BrDU positives sont ensuite marquées en immunofluorescence en utilisant un anticorps dirigés contre le BrDU puis comptées. Nous avons observé dans trois expériences indépendantes que la co-déplétion de JARID1A et JARID1B n'affecte pas la cinétique d'entrée des cellules en phase S (**figure 27A, 27B**). Ce résultat indique que l'augmentation de l'expression des gènes *Ccne1* et *Cdc6* dans les cellules déplétées pour JARID1A/B ne se traduit pas par des différences détectables dans la cinétique d'entrée en phase S.

#### Mécanisme d'action de JARID1A et B

Nous avons voulu tester si l'action de JARID1A et B sur la transcription des gènes cibles de E2F est directe. Pour cela, nous avons étudié par immunoprécipitation de Chromatine (ChIP), le recrutement de JARID1A et JARID1B au promoteur des gènes cibles de E2F *Cdc6* (dont l'expression est régulée par JARID1A et B) et *Cdc25a* (dont l'expression ne varie pas dans les cellules déplétées pour JARID1A et B). Des cellules NIH3T3 ont été synchronisées par privation de sérum, puis analysées à 0h (G0), 12h (phase S) après l'ajout de sérum. L'expression de *Cdc6* et *Cdc25a* a été analysée par RT-PCR et le recrutement de JARID1A et B au promoteur de *Cdc6* et *Cdc25a* a été analysé par immunoprécipitation de chromatine. Comme attendu, l'expression de *Cdc6* et *Cdc25a* augmente dans les cellules en phase S (**Figure 28A**).

L'analyse par ChIP montre que JARID1A et JARID1B sont recrutées au promoteur des gènes cibles de E2F *Cdc6* et *Cdc25a* aussi bien en G0 lorsque ceux-ci sont réprimés qu'en phase S, lorsqu'ils sont transcrits (figure 28B). Ceci indique que JARID1A et B sont présentes sur le promoteur *Cdc6*, suggérant qu'elles soient capables de le réguler directement. Cependant, nous n'observons pas de corrélation entre la présence de ces protéines et l'activité du promoteur *Cdc6*. De plus, elles sont recrutées sur le promoteur de *Cdc25a* qui n'est pas sensible à leur déplétion. Ces résultats indiquent qu'elles ne sont pas régulées uniquement par leur recrutement au promoteur des gènes cibles.

L'ensemble de ces données sera récapitulé et discuté dans la rubrique discussion (Axe2).



**Figure 28 : JARID1A et JARID1B sont recrutées au promoteur de *Cdc6* et *Cdc25a* aussi bien lorsqu'il s sont actif que lorsqu'ils sont réprimé s**

Des fibroblastes NIH3T3 ont été déprivés en sérum pendant 48h puis relancés dans le cycle en rajoutant du sérum

**A/** Analyse par RT-PCR à 0 (G0), ou 12h (phase S) après ajout de sérum des niveaux d'expression de *Cdc6* et *Cdc25a* gènes cible de E2F, normalisés par  $\beta$ 2M. Le niveau en G0 a été ramené à 1.

**B/** Les cellules en G0, G1/S et S ont été analysées par immunoprécipitation de chromatine sans anticorps (na ) ou avec un anticorps dirigé contre JARID1A, ou JARID1B.

La région correspondant au promoteur CDC6 a été quantifiée en triplicat par PCR quantitative. Les résultats sont présentés sous forme de pourcentage de l'input. Les barres d'erreurs représentent la variabilité sur les triplicats de qPCR.

Est présentée une expérience représentative, ce résultat a été observé dans deux expériences indépendantes



## Discussion :

### Axe1 : Rôle de JMJD2A dans la transcription des gènes ribosomiques en réponse au sérum

La transcription des gènes ribosomiques (ADNr) en pré-ARNr par la Pol-I a lieu dans les nucléoles. C'est la première étape de la biogénèse des ribosomes. La biogénèse des ribosomes est un processus extrêmement régulé à différentes étapes (et en particulier au niveau de la transcription du pré-ARNr), car elle permet de réguler la synthèse protéique globale, impactant ainsi sur l'adaptation de la croissance et la prolifération cellulaire aux conditions environnementales. La biogénèse des ribosomes est extrêmement coûteuse en énergie, et de ce fait, la transcription Pol-I, est régulée en fonction de la disponibilité en facteurs de croissance et en nutriments. Dans les cellules privées en facteurs de croissance et/ou en nutriments, elle est réprimée. En présence de facteurs de croissance/nutriments elle est activée. Cette régulation est sous le contrôle de voies de signalisation cellulaire comme les voies PI3K, mTOR et MAPK parmi les mieux décrites (Kusnadi *et al*, 2015). La chromatine participe également à cette régulation. Les mécanismes à la jonction entre les voies de signalisation et la chromatine dans ces processus sont encore mal connus.

Nous avons montré que JMJD2A est impliquée dans la régulation de la transcription Pol-I. JMJD2A participe à l'activation de la transcription Pol-I en réponse aux facteurs de croissance. En effet, dans les cellules privées en sérum où la transcription Pol-I est réprimée, JMJD2A est délocalisée des nucléoles. En réponse au sérum, elle est transloquée dans les nucléoles où elle est requise pour l'activation subséquente de la transcription Pol-I. Nous avons montré que l'accumulation nucléolaire de JMJD2A en réponse au sérum est régulée par une voie Phosphatidyl-inositol-3-Kinase (PI3K) indépendante d'AKT. Son rôle dans l'activation de la transcription Pol-I est dépendant de son activité déméthylase. Ainsi, JMJD2A intervient dans la déméthylation de H3K9me3 au promoteur des ADNr, événement nécessaire à leur activation transcriptionnelle en réponse au sérum.

Dans ce chapitre, je présente les implications de cette étude sur notre compréhension des mécanismes épigénétiques qui régulent la transcription Pol-I en réponse aux facteurs de croissance, et propose des pistes qui nous permettraient d'améliorer cette compréhension. Je présente des questions qui, selon moi, seront un enjeu majeur dans le domaine dans les années à venir et je propose de nouvelles approches expérimentales pour les aborder. Pour finir, j'aborde l'impact de nos travaux, et de récentes données sur JMJD2A dans le ciblage de

JMJD2A pour le traitement des cancers et l'hypertrophie cardiaque ventriculaire, deux pathologies de la croissance et la prolifération cellulaire.

## JMJD2A dans la régulation épigénétique des ADNr en réponse au sérum :

### Des gènes réprimés qui recrutent l'ARN Polymérase, quel mécanisme ? :

Les copies euchromatiniennes des ADNr peuvent être régulées au niveau chromatinien pour adapter la transcription Pol-I aux besoins énergétiques de la cellule. Il a ainsi été montré que dans les cellules privées en glucose, les ADNr peuvent être placés dans un état chromatinien réprimés où ils sont diméthylés à leur promoteur sur H3K9. Plus récemment, il a été mis en évidence dans les cellules privées en sérum la mise en place de copies en pause des ADNr caractérisées par la présence concomitante à leur promoteur des méthylations H3K4me3 et H3K27me3 (Grummt & Langst, 2012).

Nous avons observé dans les cellules U2OS privées en sérum, l'existence de copies des ADNr tri-méthylées sur H3K9 et qui recrutent l'ARN Pol-I. En réponse au sérum, H3K9me3 est ensuite déméthylée de façon JMJD2A dépendante au profit de H3K9me1. Ces résultats appuient un modèle dans lequel JMJD2A régule le premier round de transcription en déméthylant H3K9me3. Dans ce modèle, la présence de H3K9me3 au promoteur des ADNr dans les cellules privées en sérum (où JMJD2A est délocalisée des nucléoles) favorise la pause de l'ARN polymérase. En présence de sérum, le recrutement de JMJD2A au nucléole permettrait la déméthylation de H3K9me3 et l'élongation de la transcription. Ainsi, JMJD2A serait requise pour permettre le premier round de transcription en réponse aux facteurs de transcription. Après le premier passage de la polymérase, les ADNr seraient déplétés en nucléosomes. JMJD2A ne serait ensuite plus requise pour maintenir la transcription. Cette hypothèse expliquerait l'absence d'effet de la déplétion de JMJD2A dans les cellules prolifératives où la transcription des ADNr est déjà activée.

Pour valider ce modèle, il faudrait dans un premier temps tester les effets de la déplétion de JMJD2A sur la transition initiation-élongation. On le pourrait en étudiant par ChIP l'effet de la déplétion de JMJD2A sur le recrutement de l'ARN Pol-I dans la région codante des ADNr en réponse au sérum.

Si JMJD2A est impliquée dans la déméthylation d'une fraction des ADNr liée par Pol-I, tri-méthylée sur H3K9 et réprimée pour la transcription, quelle est la méthyltransférase impliquée dans cette répression en réponse à une privation en sérum ? Murayama *et al.* ont montré que dans les cellules privées en glucose, Suv39H est recrutée sur les ADNr au sein d'un complexe eNOSC (Murayama *et al.*, 2008). En absence de glucose, le complexe eNOSC est recruté sur les ADNr et conduit à la diméthylation de H3K9. Suv39H peut également triméthyliser H3K9. De façon intéressante, l'activité de Suv39H est régulée par des modifications post-traductionnelles. Par exemple, l'acétylation de sa lysine 266 inhibe son activité méthyltransférase (Vaquero *et al.*, 2007). Le complexe eNOSC contient l'histone déacétylase SIRT1 qui est activée dans des conditions énergétiques défavorables (Murayama *et al.*, 2008) et pourrait à son tour activer Suv39H. On peut dans ce même raisonnement imaginer des mécanismes qui en absence de sérum favorisent l'activité tri-méthyltransférase de Suv39H. Ce modèle pourrait être testé en comparant les effets de la surexpression ou de la déplétion de Suv39H sur les niveaux de H3K9me2 et H3K9me3 dans des cellules privées en sérum ou en nutriments. Comme nous l'avons fait pour JMJD2A, il serait intéressant de caractériser le profil de recrutement de Suv39H sur la fraction des ADNr liée par Pol-I dans les cellules privées en sérum ou remises en présence de sérum, et dans celles où JMJD2A a été déplétée et où H3K9me3 est présente même en présence de sérum. Si Suv39H est impliquée dans cette régulation, on peut s'attendre à avoir un profil inverse à celui observé pour JMJD2A.

#### La privation en sérum et la mise en « pause » des ADNr :

Dans les cellules NIH3T3 privées en sérum, Xie *et al.* ont montré une augmentation du pourcentage des ADNr dits en pause. Xie *et al.* décrivent des ADNr en pause caractérisés par la présence concomitante des marques H3K4me3 et H3K27me3 et les nucléosomes en conformation NucD qui empêche le recrutement de l'ARN Pol-I (Xie *et al.*, 2012). S'agit-il d'un autre mécanisme de régulation de la transcription des ADNr, où l'état en pause décrit par Xie *et al.* est-il un état intermédiaire à celui que nous observons ?

Le positionnement du nucléosome à leur promoteur régule la transcription des ADNr. La conformation NucU du promoteur permet la transcription, tandis que la conformation NucD l'inhibe en empêchant le recrutement de l'ARN Pol-I (Li *et al.*, 2006). Les copies en pause des ADNr décrites par Xie *et al.*, sont caractérisées par des promoteurs en conformation

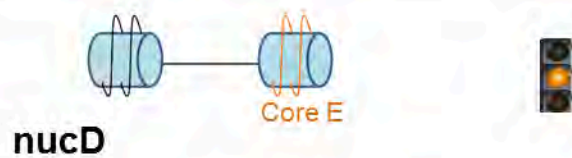
NucD. Leur activation requiert le passage par l'intermédiaire de CSB à la conformation NucU (Xie *et al*, 2012). De ce fait, s'il s'agit de la même voie, cela implique que l'état que nous observons en absence de sérum (présence de H3K9me3 et de l'ARN Pol-I), est formé après la mise en place de la conformation NucU par CSB. On pourra tester cette possibilité en caractérisant les effets de la déplétion de CSB, JMJD2A ou des deux sur la transcription des ADNr en réponse au sérum. Si ces deux protéines ne fonctionnent pas dans la même voie, on devrait avoir des effets cumulatifs de leur déplétion sur la transcription des ADNr (**Figure 29**).

#### JMJD2A coopère-t-elle avec d'autres histones déméthylases ?

En réponse au sérum, dans les cellules déplétées pour JMJD2A, on observe une augmentation de H3K9me3 et une diminution de H3K9me1, par rapport aux cellules contrôles. Ceci suggère que JMJD2A participe à la déméthylation de H3K9me3 vers H3K9me1. Il est possible que JMJD2A permette le passage de H3K9me3 à H3K9me1 car elle est capable de démétyler H3K9me3 et H3K9me2. Cependant il a été montré que JMJD2A déméthyle préférentiellement H3K9me3 (Chen *et al*, 2006; Feng *et al*, 2010). Par ailleurs, des données montrent que l'histone déméthylase PHF8 capable de démétyler H3K9me2 est recrutée au promoteur des ADNr et régule la transcription Pol-I (Zhu *et al*, 2010). JMJD2A pourrait coopérer avec d'autres histones déméthylases (notamment PHF8) dans ce processus. C'est le cas par exemple de JMJD2C (H3K9me3) et LSD1 (H3K9me2) qui coopèrent dans l'activation de gènes régulés par le récepteur des androgènes (Wissmann *et al*, 2007). De même, chez la drosophile les histones déméthylases Lid2 (H3K4me3), et Lsd1 (H3K4me2) coopèrent dans la déméthylation de H3K4me2 au promoteur des gènes cibles de la voie Notch (Di Stefano *et al*, 2011). Dans ces deux exemples, il a été montré que les déméthylases sont dans un même complexe (Lid2/Lsd1) ou capable d'interagir (JMJD2C/LSD1). Aucune donnée de la littérature ne montre que JMJD2A et PHF8 puissent être présentes dans un même complexe, et c'est une possibilité qu'il serait intéressant de tester par immunoprécipitation. En faveur de cet argument, aussi bien JMJD2A (notre étude) que PHF8

**ADNr en pause (Xie et al)**

- H3K4me3 au promoteur
- H3K27me3 au promoteur
- NucD



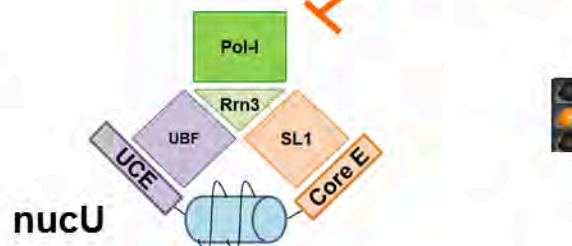
CSB ?

Pause

H3K9me3

**ADNr en Pause (nos données)**

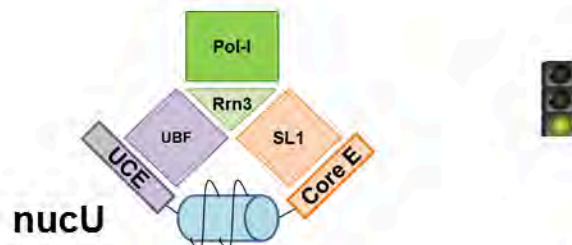
- H3K9me3
- NucU (Pol-I recrutée)



JMJD2A

**ADNr Actifs (nos données)**

- H3K9me1
- NucU (Pol-I recrutée)



**Figure 29: Régulation des ADNr en pause, modèle d'étude**

Xie *et al.*, ont décrit que les ADNr en pause dans les cellules privées en sérum sont dans la conformation nucD qui empêche le recrutement de l'ARN Pol-I. L'activation de ces copies requiert le passage *via* CSB à la conformation permissive NucU. Nous avons mis en évidence des copies en pause caractérisées par la présence de H3K9me3 et le recrutement de l'ARN Pol-I. Ce recrutement de l'ARN Pol-I implique une conformation permissive NucU. Les copies que nous observons seraient formées après le passage *via* CSB à la conformation NucU. H3K9me3 favoriserait la pause de l'ARN Polymérase. La déméthylation de H3K9me3 permet l'activation de la transcription.

(Feng *et al*, 2010) sont capables d'interagir avec la machinerie Pol-I. Il est également possible que cette coopération soit séquentielle et que JMJD2A intervienne dans un complexe spécifique pour démétyler H3K9me3 en H3K9me2, qui sert alors de substrat à PHF8. Il est intéressant de noter que PHF8 est stabilisé au promoteur des ADN<sub>r</sub> actifs par sa capacité à lier H3K4me3 *via* son domaine PH. JMJD2A possède un domaine TUDOR également capable de lier H3K4me3 (Lee *et al*, 2008). La possibilité que ce domaine soit impliqué dans la stabilisation du recrutement de JMJD2A au promoteur des ADN<sub>r</sub> reste à élucider. En ce qui concerne PHF8 et son implication dans l'activation de la transcription Pol-I, il a également été démontré que cette KDM interagit avec un complexe à activité H3K4me3 contenant WDR5 (Feng *et al*, 2010). Ainsi, il existe une coopération entre une H3K4 méthyltransférase qui méthyle H3K4 et PHF8 qui est recrutée et stabilisée aux promoteurs *via* la liaison de son domaine PHD à H3K4me3. On a donc ici un contrôle positif de la transcription *via* l'action coordonnée d'une KMT spécifique de K4 et une KDM qui maintient H3K9 sous sa forme déméthylée. Il serait réellement intéressant de compléter notre étude en testant l'hypothèse d'une coopération entre JMJD2A et PHF8 dans la déméthylation de H3K9 aux promoteurs des ADN<sub>r</sub>. Les approches incluraient des ChIP croisées pour rechercher s'il existe une interdépendance entre le recrutement de JMJD2A et PHF8, et donc les deux événements de déméthylation (caractérisation des marques H3K9me3 et H3K9me2 après manipulation des niveaux de JMJD2A/PHF8), et si WDR5 et JMJD2A peuvent se retrouver dans un même complexe dans lequel serait également présent PHF8. Ces approches permettraient de juger du lien mécanistique entre ces deux événements de déméthylation.

De façon plus générale, il serait intéressant de tester si en réponse au sérum, JMJD2A est recrutée à la chromatine avec d'autres activités modulant la chromatine. Les activités qui ont un impact complémentaire sur la transcription Pol-I (comme par exemple JMJD2A, PHF8 et G9a présentées plus haut, rubrique « Chromatine et ADN<sub>r</sub> ») sont-elles recrutées en complexes ? J'ai établi deux lignées de cellules U2OS exprimant de façon stable JMJD2A couplée à une étiquette Strep Tag ou GFP respectivement. La protéine JMJD2A taguée peut être immunoprécipitée avec des billes qui se lient spécifiquement au tag correspondant puis analysée par spectrométrie de masse en vue de mettre en évidence des interactions. Ces lignées pourraient être utilisées pour mettre en évidence des interactions entre JMJD2A et des régulateurs chromatinien en réponse au sérum. Ceci apportera des informations sur une possible coopération entre JMJD2A et d'autres régulateurs de la transcription Pol-I.

### Comment PI3K régule-t-elle la translocation de JMJD2A dans les nucléoles ? :

Nous avons montré que la PI3K régule la translocation de JMJD2A dans les nucléoles. La question qui en découle est : comment s'opère cette régulation ? La PI3K constitue le premier maillon d'une cascade de phosphorylations. En accord avec les données de la littérature évoquées plus haut qui montrent que cette voie cible par phosphorylation des

protéines régulant la transcription Pol-I, nous avons émis l'hypothèse que l'accumulation nucléolaire de JMJD2A lors du rajout de sérum passe par sa phosphorylation. C'est le cas par exemple de TIF1A (Rrn3) dont la stabilité et la translocation dans le nucléole sont régulées par sa phosphorylation par AKT et la kinase CK2 en aval (Nguyen *et al*, 2013). JMJD2A pourrait également être régulée directement par PI3K, c'est le cas d'UBF qui interagit avec PI3K et est directement phosphorylé par celle-ci (Drakas *et al*, 2004). En accord, JMJD2A possède de nombreux motifs potentiels de phosphorylation (annexe 4). Nous avons voulu tester cette hypothèse par spectrométrie de masse, dans l'idée de mettre en évidence des variations de phosphorylation de JMJD2A entre la privation et le rajout de sérum ou lors du traitement des cellules au LY294002 (inhibiteur de PI3K). À cette fin nous avons utilisé les deux lignées cellulaires stables que j'ai décrites plus haut. La protéine JMJD2A taguée a été immunoprécipitée avec des billes qui se lient spécifiquement au tag correspondant puis analysée par spectrométrie de masse en vue de mettre en évidence des phosphorylations (voir annexe 4). Nous n'avons pas été en mesure de mettre en évidence des phosphorylations de JMJD2A. Les conditions expérimentales devront être améliorées pour utiliser cette approche.

Une autre possibilité serait que JMJD2A soit transloquée dans les nucléoles *via* une autre protéine, qui elle, serait régulée par la voie PI3K. Par exemple, la voie PI3K régule par phosphorylation la translocation de Rrn3 (TIFA) dans le nucléole (Kusnadi *et al*, 2015). On pourrait tester cette hypothèse en testant (co-immunoprécipitation) si JMJD2A interagit avec des facteurs comme TIFA dont la translocation est régulée par PI3K. On pourra, si de telles interactions sont mises en évidence, tester l'impact de la déplétion (ou surexpression) de ces facteurs sur l'accumulation nucléolaire de JMJD2A en réponse au sérum.

La voie PI3K/AKT est la voie canonique. Cependant, nous avons observé que l'inhibition d'AKT n'affecte pas la translocation de JMJD2A, suggérant que JMJD2A pourrait être une cible directe de PI3K ou d'un effecteur autre qu'AKT. En effet, PI3K peut également entraîner des réponses biologiques indépendantes de AKT, *via* la kinase PDK1 qui active par phosphorylation d'autres kinases comprenant PKB, S6K, RSK, SGK et PKC (Bayascas, 2014). Des données préliminaires montrent qu'un inhibiteur de PDK1, inhibe également la translocation de JMJD2A dans les nucléoles en réponse au sérum. Ces résultats qui restent à reproduire suggèrent que la régulation de JMJD2A par PI3K passe par PDK1. Des investigations supplémentaires dans ce sens permettront de déterminer quels effecteurs en aval de PI3K et PDK1 modulent l'accumulation nucléolaire de JMJD2A.

## Régulation de la transcription Pol-I : Vers un modèle intégré

Du fait de son importance dans la vie de la cellule, comprendre les mécanismes régulant la transcription des gènes ribosomiques est crucial. Au niveau chromatinien, nombre d'études ont montré l'implication d'activités modulant la chromatine dans la régulation de la transcription Pol-I. Plusieurs questions fondamentales restent à adresser.

### Etude du recrutement des régulateurs chromatinien

Comment ces activités coopèrent-elles ? Agissent-elles toutes de façon coordonnées ? Quelle est leur mode d'action de recrutement ? Par exemple dans les cellules privées en sérum quels facteurs sont recrutés, qu'advient t-il de leur recrutement lorsque l'on rajoute du sérum ? L'outil majeur utilisé pour adresser ces questions est la ChIP. Cette technique, bien qu'extrêmement informative présente quelques limites. En effet on ne peut regarder que le recrutement d'un facteur donné à la chromatine. De plus, elle est sujette à la qualité des anticorps qui sont utilisés.

Il serait intéressant de développer une approche non biaisée qui permette l'étude des protéines recrutées sur les ADNr. Des techniques comme la PiCH (Dejardin & Kingston, 2009) et l'enChIP développées pour les télomères pourraient être adaptées aux ADNr (Fujita *et al*, 2013). Il s'agit de précipiter une séquence d'intérêt et d'identifier par spectrométrie de masse les protéines qui y sont associées. Les séquences répétées comme les ADNr sont particulièrement adaptées à ce type de technique. On pourrait comme dans le cas de l'enChIP, utiliser des protéines (TALE) qui reconnaissent les séquences d'ADNr de façon spécifique. Les protéines TALE seront couplées à un tag, qui permet ensuite d'immunoprécipiter les ADNr. On pourra ensuite par spectrométrie de masse identifier les protéines recrutées sur les ADNr. On pourrait ainsi tester par exemple l'impact de la déplétion de facteurs comme JMJD2A sur leur recrutement par des études complémentaires.

La spectrométrie de masse permet également de se concentrer sur une protéine d'intérêt dont on connaît la séquence peptidique. On pourra donc par ce type d'approche étudier, avec une notion de cinétique, dans un contexte biologique donné (en réponse au sérum par exemple), le recrutement de différentes activités à la chromatine, les modifications des histones, etc.



### Etude des cibles non-histones des histones déméthylases :

La méthylation régule également l'activité de protéines autres que les histones. Il a été montré *in vitro*, que JMJD2A est capable de démétyler des peptides triméthylés provenant de CSB et G9a, toutes les deux impliquées dans l'activation de la transcription des ADNr (Ponnaluri *et al*, 2009). JMJD2A est également présente dans le cytoplasme où elle interagit avec des protéines de la traduction et régule la synthèse protéique et ce, de façon dépendante de son activité déméthylase. Ainsi, le rôle des histones déméthylases va au-delà de leurs substrats histones. Connaître les substrats non-histones de ces protéines améliorerait notre compréhension des mécanismes régulés par les KMTs et les KDMs, leurs substrats histones ne suffisant pas toujours à expliquer leur fonction. Connaître les protéines nouvellement méthylées dans une condition donnée (rajout de sérum par exemple), serait donc une précieuse information.

Les KMTs utilisent comme donneur de méthyle la S-adénosyl méthionine (SAM). On peut tirer profit de cette caractéristique pour identifier de façon non biaisée des protéines nouvellement méthylées. Pour cela, on peut utiliser une forme modifiée de SAM que l'on rajoute au milieu de culture au moment voulu (lors du rajout de sérum par exemple). Les protéines méthylées seraient identifiées par spectrométrie de masse (les peptides apparaîtraient sous forme de doublets). Par spectrométrie de masse, on peut se concentrer sur la détection de protéines d'intérêt dont on connaît la séquence peptidique. On pourrait ainsi identifier, par exemple, des protéines méthylées en réponse au sérum, et tester l'impact de la déplétion de KDMs sur ce qu'on peut appeler le néo-méthylome. Ces données pourront être recoupées avec les données d'interactome pour identifier des cibles directes, qui pourraient être validées *in vitro*. Pour l'étude de protéines méthylées dans la régulation de la transcription Pol-I, on pourrait par exemple, purifier les nucléoles avant l'analyse par spectrométrie de masse. À ma connaissance, ce type d'approche n'a jamais été utilisé pour étudier des KDMs. Cependant l'incorporation de SAM marquée a été utilisée (Hanz *et al*, 2014), montrant que ce cofacteur peut effectivement être utilisé pour marquer des protéines nouvellement méthylées.

De tels outils s'ils sont mis au point apporteront une nouvelle dimension à notre compréhension des mécanismes chromatinien.

## JMJD2A, pathologies de la prolifération *via* la régulation de la biogénèse des ribosomes :

La synthèse protéique est étroitement liée à la prolifération cellulaire. La transcription Pol-I est la première étape de la biogénèse des ribosomes. Nous avons montré que JMJD2A est impliquée dans l'activation de la transcription Pol-I en réponse aux facteurs de croissance. De façon intéressante, une étude très récente a montré que JMJD2A, également présente dans le cytoplasme, interagit avec la machinerie de traduction et régule la synthèse protéique. Sa déplétion dans les cellules humaines HEK293T entraîne une diminution globale de la synthèse protéique (Van Rechem *et al*, 2015). Ces données avec les nôtres montrent que JMJD2A est un activateur de la synthèse protéique qui agit aussi bien au niveau des nucléoles dans la transcription des ADNr que dans le cytoplasme dans l'initiation de la traduction ; deux étapes clés de la synthèse protéique. En effet, la déplétion de JMJD2A accroît la sensibilité des cellules HEK293T à la rapamycine, un inhibiteur de la synthèse protéique (Van Rechem *et al*, 2015).

JMJD2A est surexprimée dans des cancers comme le cancer du sein où elle joue un rôle positif dans la prolifération des cellules cancéreuses (Li *et al*, 2011a). Ces informations placent JMJD2A comme une cible thérapeutique de choix dans le traitement des cancers. Elles confortent l'idée de coupler son inhibition à l'utilisation d'inhibiteurs de la synthèse protéique dans le traitement des cancers.

La transcription des ADNr, la synthèse protéique sont également dérégulées dans les pathologies de la croissance cellulaire comme l'hypertrophie cardiaque ventriculaire (Brandenburger *et al*, 2001). L'hypertrophie cardiaque suite à un infarctus du myocarde, peut conduire à une insuffisance cardiaque. JMJD2A a été impliquée *in vivo* chez la souris, dans l'induction de l'hypertrophie cardiaque musculaire. Sa déplétion inhibe l'hypertrophie cardiaque induite en réponse à une surpression de l'artère aortique. JMJD2A pourrait, au moins en partie, participer à l'hypertrophie cardiaque *via* la transcription Pol-I et la synthèse protéique. Cette hypothèse qui reste à valider ouvre la possibilité dans cette pathologie également, de coupler l'inhibition de JMJD2A à celle de la synthèse protéique pour un ciblage thérapeutique.

## Axe 2 : JARID1A et B dans la régulation transcriptionnelle des gènes cibles d'E2F :

Les gènes comme *CCNE1*, *CDC6*, *CDC25A* et *MCM5* sont requis pour l'entrée et la progression en phase S. Ces gènes doivent donc être activés lors de l'entrée en phase S et réprimés en fin de phase S et en dehors. La transcription de ces gènes est régulée par les facteurs E2F qui participent aussi bien à leur activation qu'à leur répression. Les facteurs E2F agissent en recrutant des co-régulateurs transcriptionnels, qui *via* la chromatine régulent l'expression des gènes cibles (Chen *et al*, 2009; Zhan *et al*, 2014). Pour se restreindre à la méthylation des lysines, les gènes cibles d'E2F, lorsqu'ils sont réprimés, sont caractérisés par la méthylation répressive sur H3K9 mise en place par l'histone méthyltransférase Suv39H recrutée grâce aux facteurs E2F. Lorsque ces gènes doivent être activés à la transition G1/S, ils sont méthylés sur la marque activatrice H3K4me3 mise en place par l'histone méthyltransférase MLL également recrutée grâce aux facteurs E2F (Chen *et al*, 2009; Zhan *et al*, 2014). Dans ce processus les histones déméthylases qui permettent de déméthyliser H3K9 à la transition G1/S, et de déméthyliser H3K4 en fin de phase S, ne sont pas connues, pas plus que les mécanismes qui permettent l'exclusion mutuelle entre les méthylations sur H3K9 et H3K4.

Sur la base de données de la littérature et de données préliminaires de l'équipe j'ai, dans ce deuxième axe de ma thèse, étudié l'implication des H3K4 déméthylases JARID1A et B dans la régulation de la transcription de gènes cibles d'E2F au cours du cycle cellulaire. JARID1A et B sont recrutées sur les gènes cibles d'E2F *CCNE1*, *CDC6*, *CDC25A* et *MCM5* aussi bien lorsqu'ils sont actifs que lorsqu'ils sont réprimés. La co-déplétion de JARID1A et JARID1B dans des cellules synchronisées montre que ces deux KDMs sont requises pour réprimer la transcription de *CCNE1*, *CDC6* à la transition G1/S et en phase S lorsque ces gènes sont actifs. La transcription de *CDC25A* et *MCM5* n'est pas affectée en réponse à la déplétion de JARID1A et B. La co-déplétion de JARID1A et B n'affecte pas la cinétique d'entrée des cellules en phase S.

Je présente ici les questions immédiates sur lesquelles ouvrent ces données, avec pour certaines qui ont été abordées les résultats préliminaires obtenus. Je présente également des données de la littérature parues pendant ma thèse qui ont impliqué les histones déméthylases JARID1A et JMJD2B dans l'exclusion mutuelle entre les marques antagonistes H3K9 et H3K4, axe que j'aurais voulu étudier, tout en présentant des questions qui, selon moi, restent à étudier pour mieux appréhender ces mécanismes. Pour finir, je présente l'implication de

JARID1A et B dans les cancers, en confrontant ces données avec les résultats que j'ai obtenus.

Mode d'action de JARID1A et JARID1B au niveau chromatinien et impact sur la progression dans le cycle cellulaire :

Au niveau chromatinien :

JARID1A et B participent à la répression des gènes cibles d'E2F *Ccne1* et *Cdc6* à la transition G1/S, lorsque ceux-ci sont activés. Il faudrait maintenant s'attacher à déterminer comment au niveau chromatinien, ces deux protéines régulent la transcription de ces gènes cibles. Notre hypothèse est qu'elles agissent en déméthylant H3K4me3 à leurs promoteurs. Des données récentes de la littérature présentées en introduction montrent qu'ensemble, elles déméthylent H3K4me3 aux promoteurs de gènes cibles d'E2F lors de l'arrêt irréversible du cycle cellulaire induit pendant la sénescence, appuyant fortement cette hypothèse. Il s'agira donc de tester si leur déplétion s'accompagne de la déméthylation de H3K4me3 à leurs promoteurs cibles. Pour cela, des cellules déplétées ou non pour JARID1A et B ont été relancées dans le cycle et arrêtées à la transition G1/S. Ces cellules seront analysées par immunoprécipitation de chromatine avec un anticorps dirigé contre H3K4me3 que j'ai déjà caractérisé.

Quel impact sur la progression dans le cycle cellulaire ?:

Par ailleurs, il faudra également tester l'impact de JARID1A et B sur la progression dans le cycle cellulaire, en particulier sur la sortie de la phase S. En effet, j'ai constaté que la déplétion de JARID1A et B n'affecte pas l'entrée en phase S de cellules NIH3T3 synchronisées par privation de sérum. Nous n'observons des effets des siRNA dirigés contre JARID1A et B sur la transcription de *Ccne1* et *Cdc6* qu'à la transition G1/S et pendant la phase S. Ceci suggère qu'il faudrait se concentrer sur leur impact dans la sortie de la phase S.

Il faudra avant toute chose tester si la dérégulation transcriptionnelle de *Ccne1* et *Cdc6* lorsqu'on déplete JARID1A et B se répercute au niveau protéique, aspect que je n'ai pas pu aborder jusqu'ici pour des raisons techniques (spécificité des anticorps commerciaux en Western Blot). Dans ces études, il faudra tenir compte du fait que les niveaux de CCNE1 et

CDC6 au niveau protéique sont régulés par le protéasome. Il faudrait au besoin traiter les cellules au MG132 à la transition G1/S. Si l'effet au niveau protéique sur CCNE1 et CDC6 est confirmé, on pourra tester l'impact de la dérégulation observée pour *Ccne1* et *Cdc6* sur la sortie des cellules de phase S.

Cependant, si elle représente un modèle de choix pour étudier l'entrée des cellules en phase S, la privation en sérum n'est pas le meilleur modèle pour étudier la sortie des cellules de la phase S. En effet les cellules ont tendance à se désynchroniser en fin de phase S. Par la suite, pour étudier la sortie de phase S, nous avons opté pour la synchronisation par double bloc thymidine (Tyagi *et al*, 2007). Avec cette méthode de synchronisation, les cellules sont synchronisées à la transition G1/S et restent synchrones pendant deux cycles.

Une première expérience a été initiée dans les cellules synchronisées par double bloc thymidine. J'ai testé l'effet de la déplétion de JARID1A et B sur l'expression de *Cdc6* et *Ccne1* à la transition G1/S et en fin de fin de phase S (lorsque leur expression est réprimée au niveau transcriptionnel). Les cellules ont été déplétées ou non pour JARID1A et B puis relancées dans le cycle et analysées par RT-qPCR en G1/S et en fin de phase S. Dans les cellules contrôles, on observe comme attendu un niveau d'expression de *Ccne1* plus élevé en G1/S qui diminue en fin de phase S. Dans les cellules déplétées pour JARID1A et B, on observe à la transition G1/S un niveau d'expression de *Ccne1* 50% supérieur à celui observé dans les cellules contrôles. De plus, la diminution en fin de phase S de la transcription de *Ccne1* est quasiment perdue par rapport aux cellules contrôles. Des effets similaires sont obtenus pour *Cdc6*. Cette première expérience confirme les données obtenues en synchronisant les cellules par privation en sérum, et indique que JARID1A et B sont requises pour réprimer la transcription de *Ccne1* et *Cdc6* en fin de phase S. Je pourrai donc dans ce système, tester les effets de la déplétion de JARID1A et B sur la sortie des cellules de la phase S.

#### Comment est régulée l'activité de JARID1A et B ?

Nous avons constaté que bien qu'elles soient recrutées sur plusieurs gènes cibles d'E2F (*Cdc6*, *Ccne1*, *Cdc25a*, *Mcm5*), la déplétion de JARID1A et B n'affecte la transcription que de certains d'entre eux (*Ccne1* et *Cdc6*). Il y a deux explications possibles à cette observation. La première est que dans nos conditions expérimentales la déplétion de

JARID1A et B n'est pas suffisante. Ainsi certains promoteurs (*Cdc25a* ; *Mcm5*) plus affins pour ces deux protéines même dans les cellules traitées avec les siRNA, retiennent suffisamment de JARID1A et B pour maintenir la répression transcriptionnelle. Nous pourrions tester cette possibilité en regardant par ChIP le recrutement de JARID1A et B dans les cellules déplétées pour ces deux protéines, et relancées dans le cycle.

L'autre possibilité est que la régulation par JARID1A et B est contexte dépendante. Dans ce cas, JARID1A et B bien que recrutées sur certains gènes cibles ne les répriment pas. Dans ce cas, comment cette action est-elle régulée ? Une caractérisation des promoteurs régulés (*Cdc6*, *Ccne1*) ou non (*Cdc25a*, *Mcm5*) apporterait des informations. On pourrait commencer par le recrutement des facteurs impliqués dans la régulation des gènes cibles.

Cela soulève la question, si elles agissent en déméthylant H3K4me3, de comment l'activité de ces histones déméthylases est régulée. Nous observons qu'elles sont recrutées sur les gènes cibles d'E2F aussi bien lorsqu'ils sont réprimés que lorsqu'ils sont actifs. Comment leur action répressive est-elle inhibée en début de phase S lorsque les gènes cibles doivent être transcrits ? Une possibilité serait que les facteurs E2F activateurs répriment leur activité catalytique directement ou *via* d'autres co-régulateurs. Secombe et collaborateurs ont montré par exemple, que lorsqu'elle est en complexe avec dMyc, l'activité déméthylase de Lid2 (orthologue de JARID1A et B) est inhibée (Secombe *et al*, 2007). On pourrait tester l'effet de la surexpression des facteurs E2F1-3 sur la capacité de JARID1A et B à déméthyliser H3K4me3 aux promoteurs des gènes cibles. Nous disposons également dans l'équipe de fibroblastes NIH3T3 ER-E2F1 qui permettent de tester l'activation par E2F1 seul, indépendamment du cycle cellulaire. Ces fibroblastes surexpriment une protéine E2F1 couplée au domaine de liaison au ligand du récepteur aux œstrogènes, muté pour ne lier que l'hydroxytamoxifène. Ainsi, en rajoutant l'hydroxytamoxifène, la protéine ER-E2F1 est transloquée dans le noyau où elle active la transcription des gènes cibles. Pour s'affranchir du cycle cellulaire, les cellules sont maintenues en quiescence par privation de sérum. Ce modèle permettrait de tester si l'activation d'E2F1 inhibe la capacité de JARID1A et B à déméthyliser H3K4me3.

Une autre possibilité, non contradictoire avec la précédente, est que JARID1A et B sont des cibles des Cdk/Cycline (notamment Cdk2/CyclineE) qui régulent la transition G1/S. C'est le cas de la protéine du rétinoblastome Rb qui est régulée par phosphorylation. On pourrait en fin de phase S tester ce qu'il advient de leur capacité à déméthyliser H3K4me3 si on surexprime Cdk2/CyclineE ou p57, principal inhibiteur connu de la cycline E (Henley & Dick, 2012). De façon intéressante, la cycline E étant impliquée dans l'activation des gènes

cibles à la transition G1/S, cette hypothèse, si elle est confirmée, révélerait une boucle de rétrocontrôle négatif entre JARID1A et B et la cycline E.

## JARID1A et B sont-elles des co-répresseurs des facteurs E2F6-8 ?

Les facteurs E2Fs répresseurs (E2F6-8) ont été impliqués dans la répression des gènes cibles pendant la phase S. Identifiés plus récemment, le mode d'action de ces facteurs E2Fs est bien moins documenté.

Cependant, il a été montré que E2F7 interagit *via* la protéine CtBP avec les histones déacétylases HDAC1 et HDAC2 et le complexe répresseur NuRD. CtBP est requise pour la répression transcriptionnelle par E2F7 dans des tests de transactivation. (Liu *et al*, 2013; Zhao *et al*, 2014). Quant à E2F6, il interagit avec des protéines du complexe répresseur Polycomb (Ogawa *et al*, 2002; Stielow *et al*, 2014).

D'autres études font des liens entre JARID1A et/ou JARID1B et ces co-répresseurs potentiels des facteurs E2F6 et 7. En effet, JARID1A interagit également avec HDAC1 et HDAC2 au sein du complexe répresseur Sin3B. Le complexe Sin3B est impliqué avec JARID1A et JARID1B, dans la répression des gènes cibles d'E2F au cours de la différenciation cellulaire et de la sénescence (Grandinetti *et al*, 2009; van Oevelen *et al*, 2008). JARID1A et B ont toutes les deux été décrites comme interagissant avec le complexe répresseur NuRD (Li *et al*, 2011b; Nishibuchi *et al*, 2014). Une étude récente d'interaction à grande échelle a identifié des partenaires de différentes KDMs (Marcon *et al*, 2014). Nous avons observé en analysant les données générées par cette étude qu'E2F6 est un partenaire d'interaction de JARID1B. Enfin, JARID1A fait partie du complexe répresseur Polycomb.

L'ensemble de ces données corrobore l'hypothèse d'un lien fonctionnel entre JARID1A et B et les facteurs répresseurs E2F6 et E2F7.

Ayant observé que JARID1A et B participent à la répression des gènes cibles en phase S, il serait intéressant de tester si elles sont des co-répresseurs des facteurs E2F6-8. On pourrait dans un premier temps tester par co-immunoprécipitation si JARID1A et B interagissent avec les facteurs E2F6-8. Par des expériences de co-déplétion et de rescue (surexpression de JARID1A/B et déplétion des E2F6-8 et inversement) on pourra tester si JARID1A et B et les facteurs E2F6-8 appartiennent à une même voie qui régule la transcription de *Ccne1* et *Cdc6*.

On pourra également tester si JARID1A et B interagissent (co-immunoprécipitation) ou coopèrent (co-déplétion, rescue) pendant la phase S avec certains des co-répresseurs potentiels décrits dans le paragraphe précédent.

## La co-régulation des méthylations sur H3K4 et H3K9, état de l'art :

Nous avons observé que JMJD2A, une H3K9 déméthylase est recrutée sur les gènes cibles d'E2F à la transition G1/S. Nous espérons par des analyses croisées étudier une éventuelle inter-régulation entre JARID1A et JMJD2A qui permettrait de maintenir un profil de méthylation cohérent de H3K4 et H3K9, marques antagonistes et mutuellement exclusives, aux promoteurs des gènes cibles. Depuis, deux articles publiés dans PNAS ont impliqué d'une part JARID1A et d'autre part JMJD2B dans ces processus. JARID1A est recrutée par l'histone méthyltransférase G9a (H3K9 KMT) pour déméthyliser H3K4me3 dans la répression du promoteur de l'E-globine (Chaturvedi *et al*, 2012). JMJD2B (H3K9 KDM) recrute MLL pour méthyliser H3K4me3 dans l'activation des gènes cibles du récepteur aux œstrogènes (Shi *et al*, 2011). Ces mécanismes sont-ils extrapolables aux gènes cibles d'E2F ? Le rôle joué par JMJD2B sur les gènes cibles du récepteur aux œstrogènes serait-il joué par JMJD2A (que nous retrouvons sur les gènes cibles d'E2F lorsqu'ils doivent être activés) ? En plus de coopérer avec la KMT qui méthyle la marque antagoniste, ces KDMs peuvent-elles s'opposer à la KDM qui la déméthyle ? Autant de questions qui pourraient être adressées en étudiant les gènes cibles d'E2F, avec à la clé une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires qui participent à la régulation fine du cycle cellulaire.

## JARID1A et B, dans les cancers, fonctions de JARID1A et B :

Nous avons montré que JARID1A et B agissent comme des répresseurs transcriptionnels de *Ccne1* et *Cdc6*, gènes impliqués dans la progression dans le cycle cellulaire et activés dans les cancers. Au cours de la sénescence et de la différenciation musculaire, ces deux KDMs participent à l'arrêt du cycle cellulaire au moins en partie *via* la répression de gènes du cycle cellulaire. Ces données soutiennent l'hypothèse d'un rôle de suppresseur de tumeur pour ces deux KDMs.

Cependant les données de la littérature décrivent JARID1A et B comme des oncogènes. JARID1A est activée dans les cancers gastriques, du col de l'utérus, les leucémies



et a été impliquée dans la résistance au traitement du cancer du poumon. Dans les souris K.O. pour les gènes suppresseurs de tumeurs *Rb1* (qui code pour Rb) ou *Men1* (Murine Endocrine Neoplasia), JARID1A se comporte comme un oncogène. Sa déplétion inhibe la formation de tumeurs (Lin *et al*, 2011). Quant à JARID1B, elle est surexprimée dans les cancers du sein, de la rate, de la prostate, du poumon et de la peau (Blair *et al*, 2011).

Une partie de l'explication à cette dichotomie se trouve dans la diversité des gènes cibles de JARID1A et B. Par exemple, elles ont toutes les deux été impliquées (mais dans des systèmes différents) dans la répression transcriptionnelle de p21, inhibiteur des Cdk/Cycline et suppresseur de tumeur. JARID1A a été également impliquée dans l'activation transcriptionnelle des gènes des protéines ribosomiques *RPL3*, *RPL7*, *RPL24* (Tzatsos *et al*, 2013). Ainsi, la répression des gènes cibles d'E2F, n'est clairement pas la seule fonction de ces KDMs dans la régulation du cycle cellulaire.

En effet, l'analyse par Western Blot montre une augmentation de leur expression lors de la progression en phase S. Pourtant cette augmentation ne se traduit pas par un recrutement sur les gènes cibles d'E2F que j'ai analysés par ChIP. Ceci indique que JARID1A et B peuvent jouer un rôle positif sur la progression dans le cycle indépendant des gènes cibles d'E2F. Cette augmentation de leur expression pourrait en partie s'expliquer par un rôle de ces histones déméthylases dans la synthèse protéique globale. La relance des cellules dans le cycle après privation de sérum, s'accompagne d'une activation de la synthèse protéique. En effet, en plus de réguler la transcription de protéines ribosomiques, il a été montré que JARID1A comme JMJD2A régule la synthèse protéique. L'utilisation d'un inhibiteur qui inhibe JARID1A et JMJD2A, sensibilise également les cellules à la rapamycine (inhibiteur de la voie mTOR qui régule la synthèse protéique) (Van Rechem *et al*, 2015). Ces données indiquent que JMJD2A et JARID1A (et potentiellement JARID1B, au moins par compensation) peuvent coopérer dans la régulation de la synthèse protéique. De plus, de façon intéressante, JARID1A est également présente dans les nucléoles (Benevolenskaya *et al*, 2005). Ces KDMs peuvent-elles également coopérer pour moduler la synthèse protéique *via* la transcription Pol-I ? Cette possibilité pourra être testée par des analyses croisées, en étudiant la transcription Pol-I par les mêmes approches que nous avons utilisées lors de l'étude du rôle de JMJD2A.

## Conclusion Générale :

Mes travaux de thèse ont montré l'implication des histones déméthylases JMJD2A et JARID1A et B dans la régulation de la prolifération, au niveau de l'adaptation de la synthèse protéique à la disponibilité en facteurs de croissance (JMJD2A) et du contrôle épigénétique de la division cellulaire (JARID1A et B).

De façon plus générale, la méthylation sur les lysines et par ricochet les KMTs et les KDMs qui la mettent en place et l'enlèvent, régule de nombreux processus clés de la vie de la cellule. De par leur capacité à moduler le paysage chromatinien, ces enzymes régulent la transcription de gènes cruciaux, qui sont dérégulés dans les pathologies comme le cancer. Comprendre comment elles agissent revêt donc une importance capitale. Mes travaux de thèse s'inscrivent dans cette optique et ont mis en lumière des mécanismes impliquant les KDMs JMJD2A, JARID1A et JARID1B dans ces processus. Ces travaux ouvrent également sur des questions qui restent à aborder. Comment ces trois KDMs JMJD2A, JARID1A et JARID1B et les KDMs en général coopèrent-elles avec les autres activités impliquées dans la régulation de ces processus cellulaires ? Quel est l'impact de la méthylation sur ces partenaires et dans quelle mesure les KDMs les régulent-elles ?

La réponse à ces questions améliorera notre connaissance des mécanismes qui *via* ces régulateurs épigénétiques contrôlent la prolifération cellulaire. Pour y parvenir cependant, il sera nécessaire d'améliorer les outils classiques qui permettent d'étudier la méthylation et les processus chromatinien.

## **Procédures expérimentales**

### **Culture Cellulaire**

Les cellules U2OS ou NIH3T3 de l'ATCC ont été cultivées dans du milieu DMEM 10% SVF.

Cellules U2OS :

Pour les expériences de privation et relance en sérum, les cellules à 60% de confluence sont rincées deux fois avec du PBS (Gibco) et privées en sérum pendant 24 heures dans du milieu DMEM 1g/L glucose. Pour la relance, de la transcription Pol-I, les cellules sont ensuite incubées dans du DMEM 1g/L glucose contenant 20% de SVF. Tous les milieux de culture sont supplémentés avec de la pénicilline 100U/mL et de la streptomycine 100ug/mL (Gibco).

Les concentrations finales des inhibiteurs de kinases resuspendus dans le DMSO sont : PD98059 (25μM), Rapamycine (50 nM), LY294002 (20μM) ; PI-103 (5μM), AKT-VIII (2,5 ou 5 μM). Ces inhibiteurs ont été ajoutés 1h avant de relancer les cellules et maintenus dans le milieu après le relance.

Cellules NIH3T3 :

Pour les expériences de privation et relance en sérum, les cellules à 50% de confluence sont cultivées dans du milieu DMEM 4,5g/L glucose 0.5% SVF pendant 48h. La relance se fait en remplaçant le milieu par du DMEM 4,5g/L glucose 10% SVF.

### **Transfection des Cellules NIH3T3 :**

Pour les expériences de transfection avec des siRNA, les cellules NIH3T3 sont privées en sérum pendant 24 heures puis transfectées dans du milieu DMEM 0.5% SVF avec pour chaque cible, un pool de 4 siRNA 50nM (soit 12.5nM pour chaque siRNA). Les siRNA sont synthétisés par la compagnie Dharmacon. La transfection est faite en utilisant comme agent de transfection du Dharmafect 1 (Dharmacon) selon les indications du fabricant. Pour les boîtes 6 puits, les cellules sont transfectées avec 4μL de Dharmafect dans un volume final de 2mL de milieu par puits contre 28μL de Dharmafect dans un volume final de 7mL pour les boîtes diamètre 10 cm. 24h après transfection, les cellules sont relancées dans le cycle en remplaçant le milieu de culture par du milieu DMEM 10% SVF. Les milieux pour la transfection et la relance après transfection ne contiennent pas d'antibiotiques.

## Constructions de KDM4A et transfection des cellules U2OS

Les plasmides exprimant la protéine humaine sauvage HA-KDM4A sous le contrôle du promoteur CMV nous ont été gracieusement donnés par J. Christensen. Le mutant catalytique KDM4A-H188A a été généré à partir de ces plasmides en utilisant le kit de mutagenèse Quick change mutagenesis (Agilent Technologies) en se basant sur les instructions du fabricant. Les différents siRNA ont été synthétisés par la compagnie Eurogentec et détaillés tableau 7. Pour la transfection,  $10^6$  cellules sont électroporées avec des siRNA double brins à une concentration de  $2\mu\text{M}$  ou avec 2 $\mu\text{g}$  de plasmide ou encore les deux combinés en utilisant le dispositif de transfection Nucleofector (Amaxa AG, Cologne, Allemagne) en accord avec les instructions du fabricant (Tampon nucleofector V, programme X001).

Tableau 7 : Séquences ou références des siRNA utilisés

	Cibles	Séquences ou Références	Fabricant
Cellules U2OS	KDM4A-1	GUUCGAGAGUCCGCAAGAdTdT	Eurogentec
	KDM4A-2	GUAUGAUCUCCAGACUUAdTdT	Eurogentec
	KDM4A-3	GGGAUUCUAUCUCUUCUGAdTdT	Eurogentec
	Non-targeting (Src)	CAUGUCAUGUGUCACAUCUdTdT	Eurogentec
Cellules NIH3T3	JARID1A	M-056852-01	Dharmacon
	JARID1B	M-058161-01	Dharmacon
	Contrôle 1	D-001206-13	Dharmacon
	Contrôle 2	D-001206-14	Dharmacon

### **Marquage des ARN et analyse des ARNr** (Equipe de Kostya Panov)

Le marquage des ARNs dans les cellules U2OS (environ 70% de confluence ou 50% pour les expériences de privation-relance) et l'analyse des ARN ont été effectués en utilisant 10mCi de <sup>3</sup>H-Uridine pour 0.2 à 0.4 10<sup>5</sup> cellules par puits de boîtes de culture 6 puits. Les ARNs ont été extraits (Kit Pure Link RNA Mini Kit, Life Technologies). 2ug d'ARN marqués à la <sup>3</sup>H-Uridine ont été déposés sur gel d'agarose 1% Formaldéhyde pour migration 95 minutes à 120 Volts dans du tampon MOPS1X, puis transférés sur membrane Hybond-N (Amersham) et pontées aux ultraviolets (Ultraviolet cross-linker ; UVP). Ils sont analysés par imagerie du tritium en utilisant les plaques Fuji Tritium (ou après traitement au PerkinElmer En<sup>3</sup>Hance spray, ils sont exposés aux films Kodak Biomax à -80°C) et quantifiés en utilisant le logiciel Aida. Les variations sont calculées à partir de trois expériences indépendantes.

Le marquage *in situ* des ARN a été effectué en utilisant de la 5 Fluoro- Uridine (5FUrd). Les cellules sont incubées en présence de 5FUrd 1mM pendant 30 minutes avant fixation au paraformaldéhyde 4%, 15minutes à 4°C. L'incorporation de 5FUrd a été analysée par immunofluorescence avec un anticorps dirigé contre le BrdU (BU-33 Sigma). Toutes les étapes du marquage sont effectuées sur la glace en présence d'inhibiteurs de RNase (Riboguard Epicentre) 0.4U/mL. Le marquage fluorescent est quantifié sur 100 à 200 cellules par lamelle en utilisant une macro développée dans l'équipe pour le logiciel ImageJ (NIH) et analysé en utilisant le logiciel R open source (<http://www.R-project.org>).

### **Extraction des ARN et reverse transcription :**

Les ARNs sont extraits à l'aide du Kit RNeasy (Qiagen) conformément aux instructions du fabricant, puis dosés au Nanodrop ND1000 (Labtech). Les ARN sont reverse transcrits en ADNc en utilisant la Reverse Transcriptase Im Prom-II (Promega) en partant de 1 µg d'ARN et 500ng d'amorces dégénérées (Random primers Promega). Les ADNc obtenus sont quantifiés par qPCR. Les différentes amorces utilisées sont présentées dans le tableau 8.

### **Quantification par qPCR :**

Les ADNc sont quantifiés par PCR en temps réel à l'aide du dispositif icycler (*Biorad*). Les quantifications sont réalisées en triplicat avec le mix IQ sybergreen (*Biorad*) selon les indications du fournisseur.

Tableau 8 : Séquences des amorces utilisées en RT-qPCR

	Cibles	Amorces	Séquences
Cellules U2OS	JMJD2A	Forward Reverse	CACATCCACCGGACTTCTTT GTTCTCGGTGTTTCAGCCAAT
	JMJD2B	Forward Reverse	TCAGGGTTGTACCCGAAGAG GCCCACCTTTGCAGAATAAA
	JMJD2C	Forward Reverse	GCTTGCGAGAAGGTCATTTT AGACAGTCTCGGCTCACGAT
	rRNA	Forward Reverse	GCCCGGGAGAGCACGAC GCGTGTCAGGCGTTCTCG
	UBF	Forward Reverse	CCCCTTATTTCCGCTTCTTC TTTCGCTCGAACTCCTGTTT
	RPA194	Forward Reverse	ACATTTGGATTTCGCCTTCAG TGTCTGGGCAGATGACTGAG
Cellules NIH3T3	JARID1A	Forward Reverse	CGACCACAAAACATGCAAAC CCTGGCAGTAGGAGCAAAAG
	CDC25A	Forward Reverse	GGGAAGCATCAGGATTTGAA CACCCCTTGATGTGACCTCCT
	MCM5	Forward Reverse	ACTGGATCGAGGTGGAGATG GGCATCTGACTTGAGCATGA
	JARID1B	Forward Reverse	AGTGGCTTTCCTGTTCGAGA AAGCACATGCCACATACAA
	CDC6	Forward Reverse	CAGTGCTGCGATCCAGTTCT CCTGACATCCGACTCCACAA
	CCNE1	Forward Reverse	CCTGCAGATGCTGTGCTCTA AGGTGGCTGGTGTACTTGAC

## Immunoprécipitation de chromatine

Les cellules U2OS à 70% de confluence (Equipe de Kostya Panov) ou les cellules NIH3T3 à 50% de confluence sont fixées au formaldéhyde 1%, 10 minutes à température ambiante. L'action du formaldéhyde est ensuite arrêtée en ajoutant de la glycine 0.125M pendant 5 minutes. La chromatine est ensuite soniquée (Sonicateur Bioruptor Diagenode) en fragments de 300 paires de base environ. L'immunoprécipitation est réalisée à partir de la chromatine de  $1.10^6$  cellules. Les différents anticorps utilisés et leurs quantités sont présentés dans le tableau 9.

Pour les cellules U2OS, les ADN immunoprécipités sont analysés par qPCR avec des amorces amplifiant 8 régions différentes des copies d'ADNr (Promoteur, IGS4, 18S, 5.8S et 28S, Termineur, IGS1 et 5'ETS) (Tableau 10). Les amplifications par qPCR sont réalisés avec un dispositif Lightcycler 480 (Biorad) dans un volume réactionnel de 10uL par puits en triplicats sur des plaques 96 puits.

Pour les cellules NIH3T3, les ADN immunoprécipités sont analysés avec les amorces indiquées (tableau 11). Les quantifications sont réalisées avec un dispositif iCycler (Biorad) dans un volume réactionnel de 25 uL par puits en triplicats sur des plaques 96 puits.

Tableau 9 : Anticorps utilisés en ChIP

	Cibles	Fournisseur	Référence	Quantité par IP
Cellules U2OS	hA135 (N-17)	Santa-Cruz	Sc-17913	5 µg
	KDM4A/JMJD2A	Bethyl	A300-861A	5 µg
	KDM4A/JMJD2A	Sigma	SAB3500095	5 µg
	H3	Abcam	Ab 1791	5 µg
	H3K9me1	Diagenode	pAb-065-050	4 µg
	H3K9me2	Diagenode	pAb-060-050	4 µg
	H3K9me3	Diagenode	MAb-146-050	4 µg
	H3K36me3	Diagenode	CS-058-100	20 µg
	rabbit IgG	Sigma	I5006	5 µg
	sheep IgG	Sigma	I5131	5 µg
	mouse IgG	Sigma	I5381	5 µg
Cellules NIH3T3	JARID1A	Cell Signalling	D28B10	5ug
	JARID1B	Bethyl laboratories	A300-813 A	5ug

Tableau 10: Amorces utilisées pour les quantifications des ADNr en ChIP (Cellules U2OS).

Tetraplex	Region	Name	Position*	Sequence (5'-3')
I	Promoteur	Pr_F	42941-42956	GCCCCGGGGGAGGTAT
		Pr_R	42995-17	GAGGACAGCGTGTCTAGCAATAA
		Pr_p	42958-42982	FAM-TCTTTCGCTCCGAGTCGGCATTTTG-BHQ2
	18S	18S_F	4390-4404	CCCGCCCCTTGCTC
		18S_R	4426-4443	CCGCGGGACACTCAGCTA
		18S_p	4406-4424	RED-CGGCGCCCCCTCGATGCTC-BHQ2
	5.8S	5.8_F	6452-6470	TGTGAAACCTTCCGACCCC
		5.8_R	6509-6524	GGGGTTGCGTCAGGCC
		5.8_p	6475-6503	Cy5-CGGAGTCCGGTCCCGTTTGCTGTCTCGTC-BHQ2
	IGS2	I2_F	35996-36012	CGGGCCTTGGCAGATTC
		I2_R	36107-36126	CGCGCGTAGAGGAGAGATTT
		I2_p	36067-36089	HEX-CCCCGAGTGACTGTGGCTCGCAC-BHQ2
II	5'ETS	5E_F	1783-1799	CCGTGCCGAGTCGTGAC
		5E_F	1844-1859	CGCTTTCCAGGGCCA
		5E_p	1803-1821	Cy5-TGCCGACGACCGCGTTTGC-BHQ2
	28S	28S_F	11740-11763	GAGATTCCCACTGTCCCTACCTAC
		28S_R	11792-11808	CTGATTCCGCCAAGCCC
		28S_p	11765-11788	FAM-ATCCAGCGAAACCACAGCCAAGGG-BHQ2
	IGS1	I1_F	20171-20187	GCGAGGCACAGCGCATC
		I1_R	20252-20271	GGCATCAGCTCCAAGTCCAG
		I1_p	20189-20211	RED-CTTTGGAAGCCGCGGCAACGCCT-BHQ2



Tableau 11 : Amorces utilisées pour les quantifications des régions promotrices gènes cibles de E2F en ChIP

Gènes Cibles	amorces	séquences
<i>Cdc6</i>	Forward	AGACCTGGGGCTGTCCTATT
	Reverse	TCTCCCGCGACAAATTCTAC
<i>Cdc25a</i>	Forward	TAACGCTAAGGCCACTTTGG
	Reverse	TCCGACTAACTCGCCTCACT

### Immunoprécipitation séquentielle de chromatine (sChIP) :

La première immunoprécipitation est réalisée à partir de la chromatine de  $7.10^6$  Cellules, en utilisant 200ug d'anticorps dirigés contre la sous-unité RPA135 de l'ARN Pol-I et 200µL de billes magnétiques couplées aux protéines A et G. La chromatine est éluée des billes en deux étapes. Dans un premier temps, les billes sont incubées overnight à 4°C dans 400µL de tampon d'éluion (1% Triton X-100, 2mM EDTA, 150 mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH 8.1) contenant 80µg de peptide RPA135 (N-17Santa Cruz). Ensuite les billes sont resuspendues dans 100µL de DTT 10mM dans du tampon d'éluion et incubées 30minutes à 37°C. Les éluats des deux étapes sont mélangés et leur volume total est ajusté à 5mL en utilisant du tampon d'Immunoprécipitation (1% X-100, 0.1% Sodium déoxycholate, 1mM EDTA, 125 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5).

La seconde immunoprécipitation est réalisée en utilisant 1mL de la chromatine précédemment purifiée, soit l'équivalent de  $(1,4 \cdot 10^6)$  Cellules), les anticorps décrits tableau 9 ou les IgG (contrôle) et 30 µL de billes magnétiques couplées aux protéines A/G (Life technologies). L'ADN immunoprécipité est ensuite analysé par qPCR avec des amorces amplifiant 8 régions différentes des copies d'ADNr (Promoteur, IGS4, 18S, 5.8S et 28S, Termineur, IGS1 et 5'ETS) (Voir tableau 10). Les amplifications par qPCR sont réalisées avec un dispositif Lightcycler 480 (Biorad) dans un volume réactionnel de 10uL par puits en triplicats sur des plaques 96 puits. Les résultats sont présentés sous la forme de pourcentage d'input et normalisés par rapport aux signaux obtenus avec les IgG Contrôle et par le signal H3 (lorsque cela est pertinent). Les barres d'erreurs présentent les variations sur 3 expériences indépendantes.

## Immunofluorescence

Les cellules sont fixées avec du paraformaldéhyde 4% à 4°C et perméabilisées avec du Triton X-100 (0.5% dans du PBS). Lorsque cela est indiqué, la perméabilisation est effectuée 5 minutes au Triton X-100 1% avant la fixation (Extraction). Les cellules sont ensuite incubées à 4°C overnight avec les anticorps primaires indiqués tableau 12. Les anticorps secondaires couplés aux fluorophores AlexaFluor488 ou AlexaFluor594 proviennent de Fischer Scientific. Les observations ont été faites avec un microscope à fluorescence (DM5000 ; Leica, Wetlar, Allemagne) équipé d'une caméra ccd. Les images sont acquises avec le logiciel Metamorph Imaging system (Universal Imaging Corps., West Chester PA). Pour les acquisitions en coupes de Z, les observations sont faites avec un microscope DM6000 Leica équipé de filtres semrock, d'un piezofocus PiFoc (Physis Instrumente), et d'une caméra CollSnapHQ2 (Roper scientific), contrôlés par le logiciel Metamorph (Universal imaging Corp). 5 coupes en Z sont réalisées avec un pas de 0.2 µm puis projetées sur un seul plan.

Tableau 12 : Anticorps utilisés en immunofluorescence

Cibles	Fournisseurs	Références	Concentrations en IF
JMJD2A	Bethyl	A-300-861A	0,5 µg/mL
JMJD2A	Sigma	HPA007610	0,5 µg/mL
HA	Cell signaling	C29F4	1 µg/mL
RPA194	Santa Cruz	Sc-48385	1 µg/mL
UBF	Santa Cruz	Sc-13125	1 µg/mL
BrdU	Sigma	BU-33	2 µg/mL

## Western Blot

Les cellules sont lysées dans du tampon *NuPage* (Invitrogen), dénaturées 5 minutes à 85°C, puis les protéines sont séparées par électrophorèse sur gel acrylamide 3-8% (Nupage Invitrogen) et transférées sur une membrane de PVDF. La membrane est saturée 30 min dans du PBS/0.5% Tween 20/10% lait écrémé (*Régilait*) puis incubée overnight à 4°C sous agitation avec l'anticorps primaire à la concentration voulue dans du PBS/0.5% Tween20/2% lait (tableau 13). Après lavage au PBS/0,5% Tween20, la membrane est incubée 2h avec un anticorps anti-Lapin ou anti-Souris couplé HRP (Amersham) dans PBS/Tween20/ 2% lait. La révélation par chimioluminescence se fait à l'aide du Kit lumilight (Roche) sur film photographique (Amersham Hyperfilm ECL).

Tableau 13 : Anticorps utilisés en Western Blot

Cibles	Fournisseurs	Références	Dilutions en Western Blot
JARID1A	Cell Signalling	D28B10	1/500
JARID1B	Bethyl laboratories	A300-813-A	1/5000
CDC6	Santa Cruz	SC 9964	1/500
$\alpha$ -Tubuline	Sigma	T6199	1/25000

### Immunoprécipitation

$10^7$  cellules sont resuspendues dans du tampon hypotonique (10mM Tris pH 7.4, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1mM DTT. Les cellules sont ensuite cassées en utilisant un Dounce B et un piston, puis les noyaux sont culottés en centrifugeant 10 minutes à 500g. Les noyaux sont ensuite lysés dans du tampon d'IP (10mM Tris pH 8, 0.4% NP40, 300mM NaCl, 10% Glycérol, 1mM DTT, inhibiteurs de protéases *Roche*, inhibiteurs de phosphatases *Sigma*). Les lysats sont dilués dans un volume de tampon de dilution (10mM Tris pH 8, 5mM CaCl<sub>2</sub>, 2U/mL DNase RQ1 *Promega*) puis incubés overnight à 4°C avec un anticorps dirigé contre JMJD2A (A-300-861-A, Béthyl) à une concentration de 1µg/mL ou avec un anticorps anti HA (C29F4 Cell Signalling) utilisé comme contrôle. Les complexes protéiques sont culottés en utilisant un mix 1:1 de protéines A couplées à des billes d'agarose et de protéine G couplées à des billes de sépharose (*Sigma*). Après plusieurs lavages dans du tampon d'IP, les billes sont éluées dans du tampon de lyse NuPAGE sample lysis Buffer (*Invitrogen*) et analysées par western Blot. Toutes ces étapes sont réalisées à 4°C.

## Références bibliographiques

Ait-Si-Ali S, Guasconi V, Fritsch L, Yahi H, Sekhri R, Naguibneva I, Robin P, Cabon F, Polesskaya A and Harel-Bellan A (2004) A Suv39h-dependent mechanism for silencing S-phase genes in differentiating but not in cycling cells. *EMBO J* 23(3): 605-615

Ait-Si-Ali S, Polesskaya A, Filleur S, Ferreira R, Duquet A, Robin P, Vervish A, Trouche D, Cabon F and Harel-Bellan A (2000) CBP/p300 histone acetyl-transferase activity is important for the G1/S transition. *Oncogene* 19(20): 2430-2437

Akimoto C, Kitagawa H, Matsumoto T and Kato S (2008) Spermatogenesis-specific association of SMCY and MSH5. *Genes Cells* 13(6): 623-633

Albert M, Schmitz SU, Kooistra SM, Malatesta M, Morales Torres C, Rekling JC, Johansen JV, Abarrategui I and Helin K (2013) The histone demethylase Jarid1b ensures faithful mouse development by protecting developmental genes from aberrant H3K4me3. *PLoS Genet* 9(4): e1003461

Angelov D, Molla A, Perche PY, Hans F, Cote J, Khochbin S, Bouvet P and Dimitrov S (2003) The histone variant macroH2A interferes with transcription factor binding and SWI/SNF nucleosome remodeling. *Mol Cell* 11(4): 1033-1041

Attwooll C, Lazzerini Denchi E and Helin K (2004) The E2F family: specific functions and overlapping interests. *EMBO J* 23(24): 4709-4716

Bannister AJ and Kouzarides T (2011) Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* 21(3): 381-395

Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I and Zhao K (2007) High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129(4): 823-837

Bayascas JR (2014) PDK1: the major transducer of PI 3-kinase actions. *Curr Top Microbiol Immunol* 346: 9-29

Beck DB, Burton A, Oda H, Ziegler-Birling C, Torres-Padilla ME and Reinberg D (2012a) The role of PR-Set7 in replication licensing depends on Suv4-20h. *Genes Dev* 26(23): 2580-2589

Beck DB, Oda H, Shen SS and Reinberg D (2012b) PR-Set7 and H4K20me1: at the crossroads of genome integrity, cell cycle, chromosome condensation, and transcription. *Genes Dev* 26(4): 325-337

Becker PB and Workman JL (2013) Nucleosome remodeling and epigenetics. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5(9)

Beerens N, Hoeijmakers JH, Kanaar R, Vermeulen W and Wyman C (2005) The CSB protein actively wraps DNA. *J Biol Chem* 280(6): 4722-4729

Benetti R, Gonzalo S, Jaco I, Schotta G, Klatt P, Jenuwein T and Blasco MA (2007) Suv4-20h deficiency results in telomere elongation and derepression of telomere recombination. *J Cell Biol* 178(6): 925-936

Benevolenskaya EV, Murray HL, Branton P, Young RA and Kaelin WG, Jr. (2005) Binding of pRB to the PHD protein RBP2 promotes cellular differentiation. *Mol Cell* 18(6): 623-635

Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Plath K *et al* (2006) A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 125(2): 315-326

Berry WL and Janknecht R (2013) KDM4/JMJD2 histone demethylases: epigenetic regulators in cancer cells. *Cancer Res* 73(10): 2936-2942

Berry WL, Kim TD and Janknecht R (2014) Stimulation of beta-catenin and colon cancer cell growth by the KDM4B histone demethylase. *Int J Oncol* 44(4): 1341-1348

Berry WL, Shin S, Lightfoot SA and Janknecht R (2012) Oncogenic features of the JMJD2A histone demethylase in breast cancer. *Int J Oncol* 41(5): 1701-1706

Beshiri ML, Holmes KB, Richter WF, Hess S, Islam AB, Yan Q, Plante L, Litovchick L, Gevry N, Lopez-Bigas N *et al* (2012) Coordinated repression of cell cycle genes by KDM5A and E2F4 during differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(45): 18499-18504

Bierhoff H, Dundr M, Michels AA and Grummt I (2008) Phosphorylation by casein kinase 2 facilitates rRNA gene transcription by promoting dissociation of TIF-IA from elongating RNA polymerase I. *Mol Cell Biol* 28(16): 4988-4998

Biterge B and Schneider R (2014) Histone variants: key players of chromatin. *Cell Tissue Res* 356(3): 457-466

Black BE and Bassett EA (2008) The histone variant CENP-A and centromere specification. *Curr Opin Cell Biol* 20(1): 91-100

Black JC, Allen A, Van Rechem C, Forbes E, Longworth M, Tschop K, Rinehart C, Quiton J, Walsh R, Smallwood A *et al* (2010) Conserved antagonism between JMJD2A/KDM4A and HP1gamma during cell cycle progression. *Mol Cell* 40(5): 736-748

Black JC, Manning AL, Van Rechem C, Kim J, Ladd B, Cho J, Pineda CM, Murphy N, Daniels DL, Montagna C *et al* (2013) KDM4A lysine demethylase induces site-specific copy gain and rereplication of regions amplified in tumors. *Cell* 154(3): 541-555

Black JC, Van Rechem C and Whetstine JR (2012) Histone lysine methylation dynamics: establishment, regulation, and biological impact. *Mol Cell* 48(4): 491-507

Blair LP, Cao J, Zou MR, Sayegh J and Yan Q (2011) Epigenetic Regulation by Lysine Demethylase 5 (KDM5) Enzymes in Cancer. *Cancers (Basel)* 3(1): 1383-1404

Blais A and Dynlacht BD (2007) E2F-associated chromatin modifiers and cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol* 19(6): 658-662

- Blais A, van Oevelen CJ, Margueron R, Acosta-Alvear D and Dynlacht BD (2007) Retinoblastoma tumor suppressor protein-dependent methylation of histone H3 lysine 27 is associated with irreversible cell cycle exit. *J Cell Biol* 179(7): 1399-1412
- Bogdanovic O and Veenstra GJ (2009) DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma* 118(5): 549-565
- Brandenburger Y, Jenkins A, Autelitano DJ and Hannan RD (2001) Increased expression of UBF is a critical determinant for rRNA synthesis and hypertrophic growth of cardiac myocytes. *FASEB J* 15(11): 2051-2053
- Brehm A, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ and Kouzarides T (1998) Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature* 391(6667): 597-601
- Buratowski S (2009) Progression through the RNA polymerase II CTD cycle. *Mol Cell* 36(4): 541-546
- Buratowski S and Kim T (2010) The role of cotranscriptional histone methylations. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 75: 95-102
- Cao J and Yan Q (2012) Histone ubiquitination and deubiquitination in transcription, DNA damage response, and cancer. *Front Oncol* 2: 26
- Cao R, Tsukada Y and Zhang Y (2005) Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing. *Mol Cell* 20(6): 845-854
- Cardamone MD, Tanasa B, Chan M, Cederquist CT, Andricovich J, Rosenfeld MG and Perissi V (2014) GPS2/KDM4A pioneering activity regulates promoter-specific recruitment of PPARgamma. *Cell Rep* 8(1): 163-176
- Carrozza MJ, Li B, Florens L, Suganuma T, Swanson SK, Lee KK, Shia WJ, Anderson S, Yates J, Washburn MP *et al* (2005) Histone H3 methylation by Set2 directs deacetylation of coding regions by Rpd3S to suppress spurious intragenic transcription. *Cell* 123(4): 581-592
- Chan JC, Hannan KM, Riddell K, Ng PY, Peck A, Lee RS, Hung S, Astle MV, Bywater M, Wall M *et al* (2011) AKT promotes rRNA synthesis and cooperates with c-MYC to stimulate ribosome biogenesis in cancer. *Sci Signal* 4(188): ra56
- Chang B, Chen Y, Zhao Y and Bruick RK (2007) JMJD6 is a histone arginine demethylase. *Science* 318(5849): 444-447
- Chaturvedi CP, Somasundaram B, Singh K, Carpenedo RL, Stanford WL, Dilworth FJ and Brand M (2012) Maintenance of gene silencing by the coordinate action of the H3K9 methyltransferase G9a/KMT1C and the H3K4 demethylase Jarid1a/KDM5A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(46): 18845-18850
- Chen HZ, Tsai SY and Leone G (2009) Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nat Rev Cancer* 9(11): 785-797

Chen Z, Zang J, Whetstine J, Hong X, Davrazou F, Kutateladze TG, Simpson M, Mao Q, Pan CH, Dai S *et al* (2006) Structural insights into histone demethylation by JMJD2 family members. *Cell* 125(4): 691-702

Cheng J, Blum R, Bowman C, Hu D, Shilatifard A, Shen S and Dynlacht BD (2014) A role for H3K4 monomethylation in gene repression and partitioning of chromatin readers. *Mol Cell* 53(6): 979-992

Cheng X and Blumenthal RM (2008) Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective. *Structure* 16(3): 341-350

Chicas A, Kapoor A, Wang X, Aksoy O, Evertts AG, Zhang MQ, Garcia BA, Bernstein E and Lowe SW (2012) H3K4 demethylation by Jarid1a and Jarid1b contributes to retinoblastoma-mediated gene silencing during cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(23): 8971-8976

Chicas A, Wang X, Zhang C, McCurrach M, Zhao Z, Mert O, Dickins RA, Narita M, Zhang M and Lowe SW (2010) Dissecting the unique role of the retinoblastoma tumor suppressor during cellular senescence. *Cancer Cell* 17(4): 376-387

Christensen J, Cloos P, Toftegaard U, Klinkenberg D, Bracken AP, Trinh E, Heeran M, Di Stefano L and Helin K (2005) Characterization of E2F8, a novel E2F-like cell-cycle regulated repressor of E2F-activated transcription. *Nucleic Acids Res* 33(17): 5458-5470

Clapier CR and Cairns BR (2009) The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu Rev Biochem* 78: 273-304

Claypool JA, French SL, Johzuka K, Eliason K, Vu L, Dodd JA, Beyer AL and Nomura M (2004) Tor pathway regulates Rrn3p-dependent recruitment of yeast RNA polymerase I to the promoter but does not participate in alteration of the number of active genes. *Mol Biol Cell* 15(2): 946-956

Clouaire T and Stancheva I (2008) Methyl-CpG binding proteins: specialized transcriptional repressors or structural components of chromatin? *Cell Mol Life Sci* 65(10): 1509-1522

Cong R, Das S, Douet J, Wong J, Buschbeck M, Mongelard F and Bouvet P (2014) macroH2A1 histone variant represses rDNA transcription. *Nucleic Acids Res* 42(1): 181-192

Cramer P (2014) A Tale of Chromatin and Transcription in 100 Structures. *Cell* 159(5): 985-994

Cuthbert GL, Daujat S, Snowden AW, Erdjument-Bromage H, Hagiwara T, Yamada M, Schneider R, Gregory PD, Tempst P, Bannister AJ *et al* (2004) Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* 118(5): 545-553

Das PP, Shao Z, Beyaz S, Apostolou E, Pinello L, De Los Angeles A, O'Brien K, Atsma JM, Fujiwara Y, Nguyen M *et al* (2014) Distinct and combinatorial functions of Jmjd2b/Kdm4b and Jmjd2c/Kdm4c in mouse embryonic stem cell identity. *Mol Cell* 53(1): 32-48

de Napoles M, Mermoud JE, Wakao R, Tang YA, Endoh M, Appanah R, Nesterova TB, Silva J, Otte AP, Vidal M *et al* (2004) Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. *Dev Cell* 7(5): 663-676

- Dejardin J and Kingston RE (2009) Purification of proteins associated with specific genomic Loci. *Cell* 136(1): 175-186
- Dhami P, Saffrey P, Bruce AW, Dillon SC, Chiang K, Bonhoure N, Koch CM, Bye J, James K, Foad NS *et al* (2010) Complex exon-intron marking by histone modifications is not determined solely by nucleosome distribution. *PLoS One* 5(8): e12339
- Di Croce L and Helin K (2013) Transcriptional regulation by Polycomb group proteins. *Nat Struct Mol Biol* 20(10): 1147-1155
- Di Stefano L, Walker JA, Burgio G, Corona DF, Mulligan P, Naar AM and Dyson NJ (2011) Functional antagonism between histone H3K4 demethylases in vivo. *Genes Dev* 25(1): 17-28
- Dillon SC, Zhang X, Trievel RC and Cheng X (2005) The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases. *Genome Biol* 6(8): 227
- Doil C, Mailand N, Bekker-Jensen S, Menard P, Larsen DH, Pepperkok R, Ellenberg J, Panier S, Durocher D, Bartek J *et al* (2009) RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins. *Cell* 136(3): 435-446
- Dou Y, Milne TA, Ruthenburg AJ, Lee S, Lee JW, Verdine GL, Allis CD and Roeder RG (2006) Regulation of MLL1 H3K4 methyltransferase activity by its core components. *Nat Struct Mol Biol* 13(8): 713-719
- Drakas R, Tu X and Baserga R (2004) Control of cell size through phosphorylation of upstream binding factor 1 by nuclear phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(25): 9272-9276
- Drygin D, Rice WG and Grummt I (2010) The RNA polymerase I transcription machinery: an emerging target for the treatment of cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50: 131-156
- Ederveen TH, Mandemaker IK and Logie C (2011) The human histone H3 complement anno 2011. *Biochim Biophys Acta* 1809(10): 577-586
- Ehrensberger AH and Kornberg RD (2011) Isolation of an activator-dependent, promoter-specific chromatin remodeling factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(25): 10115-10120
- El Messaoudi S, Fabbrizio E, Rodriguez C, Chuchana P, Fauquier L, Cheng D, Theillet C, Vandel L, Bedford MT and Sardet C (2006) Coactivator-associated arginine methyltransferase 1 (CARM1) is a positive regulator of the Cyclin E1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(36): 13351-13356
- Fang J, Chen T, Chadwick B, Li E and Zhang Y (2004) Ring1b-mediated H2A ubiquitination associates with inactive X chromosomes and is involved in initiation of X inactivation. *J Biol Chem* 279(51): 52812-52815
- Felsenfeld G and Groudine M (2003) Controlling the double helix. *Nature* 421(6921): 448-453
- Feng W, Yonezawa M, Ye J, Jenuwein T and Grummt I (2010) PHF8 activates transcription of rRNA genes through H3K4me3 binding and H3K9me1/2 demethylation. *Nat Struct Mol Biol* 17(4): 445-450



- Ferrari KJ, Scelfo A, Jammula S, Cuomo A, Barozzi I, Stutzer A, Fischle W, Bonaldi T and Pasini D (2014) Polycomb-dependent H3K27me1 and H3K27me2 regulate active transcription and enhancer fidelity. *Mol Cell* 53(1): 49-62
- Ferreira R, Naguibneva I, Mathieu M, Ait-Si-Ali S, Robin P, Pritchard LL and Harel-Bellan A (2001) Cell cycle-dependent recruitment of HDAC-1 correlates with deacetylation of histone H4 on an Rb-E2F target promoter. *EMBO Rep* 2(9): 794-799
- Fischle W, Tseng BS, Dormann HL, Ueberheide BM, Garcia BA, Shabanowitz J, Hunt DF, Funabiki H and Allis CD (2005) Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* 438(7071): 1116-1122
- Flowers S, Beck GR, Jr. and Moran E (2010) Transcriptional activation by pRB and its coordination with SWI/SNF recruitment. *Cancer Res* 70(21): 8282-8287
- Frescas D, Guardavaccaro D, Bassermann F, Koyama-Nasu R and Pagano M (2007) JHDM1B/FBXL10 is a nucleolar protein that represses transcription of ribosomal RNA genes. *Nature* 450(7167): 309-313
- Fu H, Maunakea AK, Martin MM, Huang L, Zhang Y, Ryan M, Kim R, Lin CM, Zhao K and Aladjem MI (2013) Methylation of histone H3 on lysine 79 associates with a group of replication origins and helps limit DNA replication once per cell cycle. *PLoS Genet* 9(6): e1003542
- Fujita T, Asano Y, Ohtsuka J, Takada Y, Saito K, Ohki R and Fujii H (2013) Identification of telomere-associated molecules by engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP). *Sci Rep* 3: 3171
- Garcia-Cao M, O'Sullivan R, Peters AH, Jenuwein T and Blasco MA (2004) Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases. *Nat Genet* 36(1): 94-99
- Giangrande PH, Zhu W, Schlisio S, Sun X, Mori S, Gaubatz S and Nevins JR (2004) A role for E2F6 in distinguishing G1/S- and G2/M-specific transcription. *Genes Dev* 18(23): 2941-2951
- Goodfellow SJ and Zomerdijs JC (2012) Basic mechanisms in RNA polymerase I transcription of the ribosomal RNA genes. *Subcell Biochem* 61: 211-236
- Goutte-Gattat D, Shuaib M, Ouarrhni K, Gautier T, Skoufias DA, Hamiche A and Dimitrov S (2013) Phosphorylation of the CENP-A amino-terminus in mitotic centromeric chromatin is required for kinetochore function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(21): 8579-8584
- Grandinetti KB, Jelinic P, DiMauro T, Pellegrino J, Fernandez Rodriguez R, Finnerty PM, Ruoff R, Bardeesy N, Logan SK and David G (2009) Sin3B expression is required for cellular senescence and is up-regulated upon oncogenic stress. *Cancer Res* 69(16): 6430-6437
- Gray SG, Iglesias AH, Lizcano F, Villanueva R, Camelo S, Jingu H, Teh BT, Koibuchi N, Chin WW, Kokkottou E *et al* (2005) Functional characterization of JMJD2A, a histone deacetylase- and retinoblastoma-binding protein. *J Biol Chem* 280(31): 28507-28518
- Grigoryev SA and Woodcock CL (2012) Chromatin organization - the 30 nm fiber. *Exp Cell Res* 318(12): 1448-1455

- Grummt I and Langst G (2012) Epigenetic control of RNA polymerase I transcription in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1829(3-4): 393-404
- Gutierrez GM, Kong E and Hinds PW (2005) Master or slave: the complex relationship of RBP2 and pRb. *Cancer Cell* 7(6): 501-502
- Hannan KM, Brandenburger Y, Jenkins A, Sharkey K, Cavanaugh A, Rothblum L, Moss T, Poortinga G, McArthur GA, Pearson RB *et al* (2003) mTOR-dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation domain of the nucleolar transcription factor UBF. *Mol Cell Biol* 23(23): 8862-8877
- Hanz GM, Jung B, Giesbertz A, Juhasz M and Weinhold E (2014) Sequence-specific labeling of nucleic acids and proteins with methyltransferases and cofactor analogues. *J Vis Exp*(93): e52014
- Hayakawa T, Ohtani Y, Hayakawa N, Shinmyozu K, Saito M, Ishikawa F and Nakayama J (2007) RBP2 is an MRG15 complex component and down-regulates intragenic histone H3 lysine 4 methylation. *Genes Cells* 12(6): 811-826
- Henley SA and Dick FA (2012) The retinoblastoma family of proteins and their regulatory functions in the mammalian cell division cycle. *Cell Div* 7(1): 10
- Hillringhaus L, Yue WW, Rose NR, Ng SS, Gileadi C, Loenarz C, Bello SH, Bray JE, Schofield CJ and Oppermann U (2011) Structural and evolutionary basis for the dual substrate selectivity of human KDM4 histone demethylase family. *J Biol Chem* 286(48): 41616-41625
- Huang J, Sengupta R, Espejo AB, Lee MG, Dorsey JA, Richter M, Opravil S, Shiekhhattar R, Bedford MT, Jenuwein T *et al* (2007) p53 is regulated by the lysine demethylase LSD1. *Nature* 449(7158): 105-108
- Islam AB, Richter WF, Lopez-Bigas N and Benevolenskaya EV (2011) Selective targeting of histone methylation. *Cell Cycle* 10(3): 413-424
- Jensen LR, Amende M, Gurok U, Moser B, Gimmel V, Tzschach A, Janecke AR, Tariverdian G, Chelly J, Fryns JP *et al* (2005) Mutations in the JARID1C gene, which is involved in transcriptional regulation and chromatin remodeling, cause X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet* 76(2): 227-236
- Jones B, Su H, Bhat A, Lei H, Bajko J, Hevi S, Baltus GA, Kadam S, Zhai H, Valdez R *et al* (2008) The histone H3K79 methyltransferase Dot1L is essential for mammalian development and heterochromatin structure. *PLoS Genet* 4(9): e1000190
- Kalakonda N, Fischle W, Boccuni P, Gurvich N, Hoya-Arias R, Zhao X, Miyata Y, Macgrogan D, Zhang J, Sims JK *et al* (2008) Histone H4 lysine 20 monomethylation promotes transcriptional repression by L3MBTL1. *Oncogene* 27(31): 4293-4304
- Karachentsev D, Sarma K, Reinberg D and Steward R (2005) PR-Set7-dependent methylation of histone H4 Lys 20 functions in repression of gene expression and is essential for mitosis. *Genes Dev* 19(4): 431-435
- Karlic R, Chung HR, Lasserre J, Vlahovicek K and Vingron M (2010) Histone modification levels are predictive for gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(7): 2926-2931

Katoh H, Qin ZS, Liu R, Wang L, Li W, Li X, Wu L, Du Z, Lyons R, Liu CG *et al* (2011) FOXP3 orchestrates H4K16 acetylation and H3K4 trimethylation for activation of multiple genes by recruiting MOF and causing displacement of PLU-1. *Mol Cell* 44(5): 770-784

Kawazu M, Saso K, Tong KI, McQuire T, Goto K, Son DO, Wakeham A, Miyagishi M, Mak TW and Okada H (2011) Histone demethylase JMJD2B functions as a co-factor of estrogen receptor in breast cancer proliferation and mammary gland development. *PLoS One* 6(3): e17830

Kelly RD and Cowley SM (2013) The physiological roles of histone deacetylase (HDAC) 1 and 2: complex co-stars with multiple leading parts. *Biochem Soc Trans* 41(3): 741-749

Keogh MC, Kurdistani SK, Morris SA, Ahn SH, Podolny V, Collins SR, Schuldiner M, Chin K, Punna T, Thompson NJ *et al* (2005) Cotranscriptional set2 methylation of histone H3 lysine 36 recruits a repressive Rpd3 complex. *Cell* 123(4): 593-605

Kharchenko PV, Alekseyenko AA, Schwartz YB, Minoda A, Riddle NC, Ernst J, Sabo PJ, Larschan E, Gorchakov AA, Gu T *et al* (2011) Comprehensive analysis of the chromatin landscape in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 471(7339): 480-485

Kidder BL, Hu G and Zhao K (2014) KDM5B focuses H3K4 methylation near promoters and enhancers during embryonic stem cell self-renewal and differentiation. *Genome Biol* 15(2): R32

Kim SK, Jung I, Lee H, Kang K, Kim M, Jeong K, Kwon CS, Han YM, Kim YS, Kim D *et al* (2012) Human histone H3K79 methyltransferase DOT1L protein [corrected] binds actively transcribing RNA polymerase II to regulate gene expression. *J Biol Chem* 287(47): 39698-39709

Klose RJ, Yamane K, Bae Y, Zhang D, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Wong J and Zhang Y (2006) The transcriptional repressor JHDM3A demethylates trimethyl histone H3 lysine 9 and lysine 36. *Nature* 442(7100): 312-316

Kolas NK, Chapman JR, Nakada S, Ylanko J, Chahwan R, Sweeney FD, Panier S, Mendez M, Wildenhain J, Thomson TM *et al* (2007) Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase. *Science* 318(5856): 1637-1640

Kontaki H and Talianidis I (2010) Lysine methylation regulates E2F1-induced cell death. *Mol Cell* 39(1): 152-160

Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* 128(4): 693-705

Kuo AJ, Song J, Cheung P, Ishibe-Murakami S, Yamazoe S, Chen JK, Patel DJ and Gozani O (2012) The BAH domain of ORC1 links H4K20me2 to DNA replication licensing and Meier-Gorlin syndrome. *Nature* 484(7392): 115-119

Kusnadi EP, Hannan KM, Hicks RJ, Hannan RD, Pearson RB and Kang J (2015) Regulation of rDNA transcription in response to growth factors, nutrients and energy. *Gene* 556(1): 27-34

Kwon MJ, Kim SS, Choi YL, Jung HS, Balch C, Kim SH, Song YS, Marquez VE, Nephew KP and Shin YK (2010a) Derepression of CLDN3 and CLDN4 during ovarian tumorigenesis is associated with loss of repressive histone modifications. *Carcinogenesis* 31(6): 974-983

- Kwon SH, Florens L, Swanson SK, Washburn MP, Abmayr SM and Workman JL (2010b) Heterochromatin protein 1 (HP1) connects the FACT histone chaperone complex to the phosphorylated CTD of RNA polymerase II. *Genes Dev* 24(19): 2133-2145
- Lau PN and Cheung P (2011) Histone code pathway involving H3 S28 phosphorylation and K27 acetylation activates transcription and antagonizes polycomb silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(7): 2801-2806
- Lee J, Thompson JR, Botuyan MV and Mer G (2008) Distinct binding modes specify the recognition of methylated histones H3K4 and H4K20 by JMJD2A-tudor. *Nat Struct Mol Biol* 15(1): 109-111
- Lee MG, Wynder C, Cooch N and Shiekhhattar R (2005) An essential role for CoREST in nucleosomal histone 3 lysine 4 demethylation. *Nature* 437(7057): 432-435
- Leung JY and Nevins JR (2012) E2F6 associates with BRG1 in transcriptional regulation. *PLoS One* 7(10): e47967
- Li BX, Zhang MC, Luo CL, Yang P, Li H, Xu HM, Xu HF, Shen YW, Xue AM and Zhao ZQ (2011a) Effects of RNA interference-mediated gene silencing of JMJD2A on human breast cancer cell line MDA-MB-231 in vitro. *J Exp Clin Cancer Res* 30: 90
- Li F, Huarte M, Zaratiegui M, Vaughn MW, Shi Y, Martienssen R and Cande WZ (2008) Lid2 is required for coordinating H3K4 and H3K9 methylation of heterochromatin and euchromatin. *Cell* 135(2): 272-283
- Li J, Langst G and Grummt I (2006) NoRC-dependent nucleosome positioning silences rRNA genes. *EMBO J* 25(24): 5735-5741
- Li Q, Shi L, Gui B, Yu W, Wang J, Zhang D, Han X, Yao Z and Shang Y (2011b) Binding of the JmjC demethylase JARID1B to LSD1/NuRD suppresses angiogenesis and metastasis in breast cancer cells by repressing chemokine CCL14. *Cancer Res* 71(21): 6899-6908
- Liefke R, Oswald F, Alvarado C, Ferres-Marco D, Mittler G, Rodriguez P, Dominguez M and Borggrefe T (2010) Histone demethylase KDM5A is an integral part of the core Notch-RBP-J repressor complex. *Genes Dev* 24(6): 590-601
- Lin CH, Li B, Swanson S, Zhang Y, Florens L, Washburn MP, Abmayr SM and Workman JL (2008) Heterochromatin protein 1a stimulates histone H3 lysine 36 demethylation by the Drosophila KDM4A demethylase. *Mol Cell* 32(5): 696-706
- Lin W, Cao J, Liu J, Beshiri ML, Fujiwara Y, Francis J, Cherniack AD, Geisen C, Blair LP, Zou MR *et al* (2011) Loss of the retinoblastoma binding protein 2 (RBP2) histone demethylase suppresses tumorigenesis in mice lacking Rb1 or Men1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(33): 13379-13386
- Liu B, Shats I, Angus SP, Gatz ML and Nevins JR (2013) Interaction of E2F7 transcription factor with E2F1 and C-terminal-binding protein (CtBP) provides a mechanism for E2F7-dependent transcription repression. *J Biol Chem* 288(34): 24581-24589

- Liu H, Takeda S, Kumar R, Westergard TD, Brown EJ, Pandita TK, Cheng EH and Hsieh JJ (2010a) Phosphorylation of MLL by ATR is required for execution of mammalian S-phase checkpoint. *Nature* 467(7313): 343-346
- Liu W, Tanasa B, Tyurina OV, Zhou TY, Gassmann R, Liu WT, Ohgi KA, Benner C, Garcia-Bassets I, Aggarwal AK *et al* (2010b) PHF8 mediates histone H4 lysine 20 demethylation events involved in cell cycle progression. *Nature* 466(7305): 508-512
- Lizcano F, Romero C and Vargas D (2011) Regulation of adipogenesis by nuclear receptor PPARGamma is modulated by the histone demethylase JMJD2C. *Genet Mol Biol* 34(1): 19-24
- Lo WS, Duggan L, Emre NC, Belotserkovskya R, Lane WS, Shiekhhattar R and Berger SL (2001) Snf1--a histone kinase that works in concert with the histone acetyltransferase Gcn5 to regulate transcription. *Science* 293(5532): 1142-1146
- Loh YH, Zhang W, Chen X, George J and Ng HH (2007) Jmjd1a and Jmjd2c histone H3 Lys 9 demethylases regulate self-renewal in embryonic stem cells. *Genes Dev* 21(20): 2545-2557
- Luco RF, Pan Q, Tominaga K, Blencowe BJ, Pereira-Smith OM and Misteli T (2010) Regulation of alternative splicing by histone modifications. *Science* 327(5968): 996-1000
- Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF and Richmond TJ (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389(6648): 251-260
- Magnaghi-Jaulin L, Groisman R, Naguibneva I, Robin P, Lorain S, Le Villain JP, Troalen F, Trouche D and Harel-Bellan A (1998) Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase. *Nature* 391(6667): 601-605
- Mallette FA, Mattioli F, Cui G, Young LC, Hendzel MJ, Mer G, Sixma TK and Richard S (2012) RNF8- and RNF168-dependent degradation of KDM4A/JMJD2A triggers 53BP1 recruitment to DNA damage sites. *EMBO J* 31(8): 1865-1878
- Mallette FA and Richard S (2012) JMJD2A promotes cellular transformation by blocking cellular senescence through transcriptional repression of the tumor suppressor CHD5. *Cell Rep* 2(5): 1233-1243
- Mantri M, Krojer T, Bagg EA, Webby CA, Butler DS, Kochan G, Kavanagh KL, Oppermann U, McDonough MA and Schofield CJ (2010) Crystal Structure of the 2-Oxoglutarate- and Fe(II)-Dependent Lysyl Hydroxylase JMJD6. *J Mol Biol*
- Marcon E, Ni Z, Pu S, Turinsky AL, Trimble SS, Olsen JB, Silverman-Gavrila R, Silverman-Gavrila L, Phanse S, Guo H *et al* (2014) Human-chromatin-related protein interactions identify a demethylase complex required for chromosome segregation. *Cell Rep* 8(1): 297-310
- Martini M, De Santis MC, Braccini L, Gulluni F and Hirsch E (2014) PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review. *Ann Med* 46(6): 372-383
- Mayer C, Schmitz KM, Li J, Grummt I and Santoro R (2006) Intergenic transcripts regulate the epigenetic state of rRNA genes. *Mol Cell* 22(3): 351-361

- Mayer C, Zhao J, Yuan X and Grummt I (2004) mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. *Genes Dev* 18(4): 423-434
- Metzger E, Wissmann M, Yin N, Muller JM, Schneider R, Peters AH, Gunther T, Buettner R and Schule R (2005) LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature* 437(7057): 436-439
- Metzger E, Yin N, Wissmann M, Kunowska N, Fischer K, Friedrichs N, Patnaik D, Higgins JM, Potier N, Scheidtmann KH *et al* (2008) Phosphorylation of histone H3 at threonine 11 establishes a novel chromatin mark for transcriptional regulation. *Nat Cell Biol* 10(1): 53-60
- Minc E, Allory Y, Worman HJ, Courvalin JC and Buendia B (1999) Localization and phosphorylation of HP1 proteins during the cell cycle in mammalian cells. *Chromosoma* 108(4): 220-234
- Miranda TB, Cortez CC, Yoo CB, Liang G, Abe M, Kelly TK, Marquez VE and Jones PA (2009) DZNep is a global histone methylation inhibitor that reactivates developmental genes not silenced by DNA methylation. *Mol Cancer Ther* 8(6): 1579-1588
- Molina-Serrano D, Schiza V and Kirmizis A (2013) Cross-talk among epigenetic modifications: lessons from histone arginine methylation. *Biochem Soc Trans* 41(3): 751-759
- Morey L and Helin K (2010) Polycomb group protein-mediated repression of transcription. *Trends Biochem Sci* 35(6): 323-332
- Mosammaparast N and Shi Y (2010) Reversal of histone methylation: biochemical and molecular mechanisms of histone demethylases. *Annu Rev Biochem* 79: 155-179
- Mueller D, Bach C, Zeisig D, Garcia-Cuellar MP, Monroe S, Sreekumar A, Zhou R, Nesvizhskii A, Chinnaiyan A, Hess JL *et al* (2007) A role for the MLL fusion partner ENL in transcriptional elongation and chromatin modification. *Blood* 110(13): 4445-4454
- Mujtaba S, Zeng L and Zhou MM (2007) Structure and acetyl-lysine recognition of the bromodomain. *Oncogene* 26(37): 5521-5527
- Murayama A, Ohmori K, Fujimura A, Minami H, Yasuzawa-Tanaka K, Kuroda T, Oie S, Daitoku H, Okuwaki M, Nagata K *et al* (2008) Epigenetic control of rDNA loci in response to intracellular energy status. *Cell* 133(4): 627-639
- Musselman CA, Lalonde ME, Cote J and Kutateladze TG (2012) Perceiving the epigenetic landscape through histone readers. *Nat Struct Mol Biol* 19(12): 1218-1227
- Nakagawa T, Kajitani T, Togo S, Masuko N, Ohdan H, Hishikawa Y, Koji T, Matsuyama T, Ikura T, Muramatsu M *et al* (2008) Deubiquitylation of histone H2A activates transcriptional initiation via trans-histone cross-talk with H3K4 di- and trimethylation. *Genes Dev* 22(1): 37-49
- Nakamura K, Kato A, Kobayashi J, Yanagihara H, Sakamoto S, Oliveira DV, Shimada M, Tauchi H, Suzuki H, Tashiro S *et al* (2011) Regulation of homologous recombination by RNF20-dependent H2B ubiquitination. *Mol Cell* 41(5): 515-528

- Narita M, Nunez S, Heard E, Lin AW, Hearn SA, Spector DL, Hannon GJ and Lowe SW (2003) Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 113(6): 703-716
- Navarro-Costa P, Plancha CE and Goncalves J (2010) Genetic dissection of the AZF regions of the human Y chromosome: thriller or filler for male (in)fertility? *J Biomed Biotechnol* 2010: 936569
- Nguyen AT, Xiao B, Nepl RL, Kallin EM, Li J, Chen T, Wang DZ, Xiao X and Zhang Y (2011) DOT1L regulates dystrophin expression and is critical for cardiac function. *Genes Dev* 25(3): 263-274
- Nguyen le XT and Mitchell BS (2013) Akt activation enhances ribosomal RNA synthesis through casein kinase II and TIF-IA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(51): 20681-20686
- Nicolas E, Roumillac C and Trouche D (2003) Balance between acetylation and methylation of histone H3 lysine 9 on the E2F-responsive dihydrofolate reductase promoter. *Mol Cell Biol* 23(5): 1614-1622
- Nielsen SJ, Schneider R, Bauer UM, Bannister AJ, Morrison A, O'Carroll D, Firestein R, Cleary M, Jenuwein T, Herrera RE *et al* (2001) Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature* 412(6846): 561-565
- Nishibuchi G, Shibata Y, Hayakawa T, Hayakawa N, Ohtani Y, Sinmyozu K, Tagami H and Nakayama J (2014) Physical and functional interactions between the histone H3K4 demethylase KDM5A and the nucleosome remodeling and deacetylase (NuRD) complex. *J Biol Chem* 289(42): 28956-28970
- Nishioka K, Chuikov S, Sarma K, Erdjument-Bromage H, Allis CD, Tempst P and Reinberg D (2002) Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. *Genes Dev* 16(4): 479-489
- Ogawa H, Ishiguro K, Gaubatz S, Livingston DM and Nakatani Y (2002) A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science* 296(5570): 1132-1136
- Ong CT and Corces VG (2009) Insulators as mediators of intra- and inter-chromosomal interactions: a common evolutionary theme. *J Biol* 8(8): 73
- Ooi SK, Qiu C, Bernstein E, Li K, Jia D, Yang Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Lin SP, Allis CD *et al* (2007) DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature* 448(7154): 714-717
- Outchkourov NS, Muino JM, Kaufmann K, van Ijcken WF, Groot Koerkamp MJ, van Leenen D, de Graaf P, Holstege FC, Grosveld FG and Timmers HT (2013) Balancing of histone H3K4 methylation states by the Kdm5c/SMCX histone demethylase modulates promoter and enhancer function. *Cell Rep* 3(4): 1071-1079
- Pasini D, Hansen KH, Christensen J, Agger K, Cloos PA and Helin K (2008) Coordinated regulation of transcriptional repression by the RBP2 H3K4 demethylase and Polycomb-Repressive Complex 2. *Genes Dev* 22(10): 1345-1355
- Peters AH, O'Carroll D, Scherthan H, Mechtler K, Sauer S, Schofer C, Weipoltshammer K, Pagani M, Lachner M, Kohlmaier A *et al* (2001) Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* 107(3): 323-337

Pinheiro I, Margueron R, Shukeir N, Eisold M, Fritzsche C, Richter FM, Mittler G, Genoud C, Goyama S, Kurokawa M *et al* (2010) Prdm3 and Prdm16 are H3K9me1 methyltransferases required for mammalian heterochromatin integrity. *Cell* 150(5): 948-960

Ponnaluri VK, Vavilala DT, Putty S, Gutheil WG and Mukherji M (2009) Identification of non-histone substrates for JMJD2A-C histone demethylases. *Biochem Biophys Res Commun* 390(2): 280-284

Ray S, Panova T, Miller G, Volkov A, Porter AC, Russell J, Panov KI and Zomerdiik JC (2013) Topoisomerase IIalpha promotes activation of RNA polymerase I transcription by facilitating pre-initiation complex formation. *Nat Commun* 4: 1598

Rayman JB, Takahashi Y, Indjeian VB, Dannenberg JH, Catchpole S, Watson RJ, te Riele H and Dynlacht BD (2002) E2F mediates cell cycle-dependent transcriptional repression in vivo by recruitment of an HDAC1/mSin3B corepressor complex. *Genes Dev* 16(8): 933-947

Rivera C, Gurard-Levin ZA, Almouzni G and Loyola A (2014) Histone lysine methylation and chromatin replication. *Biochim Biophys Acta* 1839(12): 1433-1439

Ross JF, Liu X and Dynlacht BD (1999) Mechanism of transcriptional repression of E2F by the retinoblastoma tumor suppressor protein. *Mol Cell* 3(2): 195-205

Rossetto D, Avvakumov N and Cote J (2012) Histone phosphorylation: a chromatin modification involved in diverse nuclear events. *Epigenetics* 7(10): 1098-1108

Rothbart SB and Strahl BD (2014) Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochim Biophys Acta* 1839(8): 627-643

Saint-Andre V, Batsche E, Rachez C and Muchardt C (2011) Histone H3 lysine 9 trimethylation and HP1gamma favor inclusion of alternative exons. *Nat Struct Mol Biol* 18(3): 337-344

Santoro R, Li J and Grummt I (2002) The nucleolar remodeling complex NoRC mediates heterochromatin formation and silencing of ribosomal gene transcription. *Nat Genet* 32(3): 393-396

Santoro R, Schmitz KM, Sandoval J and Grummt I (2010) Intergenic transcripts originating from a subclass of ribosomal DNA repeats silence ribosomal RNA genes in trans. *EMBO Rep* 11(1): 52-58

Sarma K and Reinberg D (2005) Histone variants meet their match. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(2): 139-149

Schotta G, Sengupta R, Kubicek S, Malin S, Kauer M, Callen E, Celeste A, Pagani M, Opravil S, De La Rosa-Velazquez IA *et al* (2008) A chromatin-wide transition to H4K20 monomethylation impairs genome integrity and programmed DNA rearrangements in the mouse. *Genes Dev* 22(15): 2048-2061

Schubeler D, MacAlpine DM, Scalzo D, Wirbelauer C, Kooperberg C, van Leeuwen F, Gottschling DE, O'Neill LP, Turner BM, Delrow J *et al* (2004) The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes Dev* 18(11): 1263-1271

Secombe J, Li L, Carlos L and Eisenman RN (2007) The Trithorax group protein Lid is a trimethyl histone H3K4 demethylase required for dMyc-induced cell growth. *Genes Dev* 21(5): 537-551



- Seenundun S, Rampalli S, Liu QC, Aziz A, Palii C, Hong S, Blais A, Brand M, Ge K and Dilworth FJ (2010) UTX mediates demethylation of H3K27me3 at muscle-specific genes during myogenesis. *EMBO J* 29(8): 1401-1411
- Shanower GA, Muller M, Blanton JL, Honti V, Gyurkovics H and Schedl P (2005) Characterization of the grappa gene, the Drosophila histone H3 lysine 79 methyltransferase. *Genetics* 169(1): 173-184
- Shi G, Wu M, Fang L, Yu F, Cheng S, Li J, Du JX and Wong J (2014) PHD finger protein 2 (PHF2) represses ribosomal RNA gene transcription by antagonizing PHF finger protein 8 (PHF8) and recruiting methyltransferase SUV39H1. *J Biol Chem* 289(43): 29691-29700
- Shi L, Sun L, Li Q, Liang J, Yu W, Yi X, Yang X, Li Y, Han X, Zhang Y *et al* (2011) Histone demethylase JMJD2B coordinates H3K4/H3K9 methylation and promotes hormonally responsive breast carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(18): 7541-7546
- Shi X, Hong T, Walter KL, Ewalt M, Michishita E, Hung T, Carney D, Pena P, Lan F, Kaadige MR *et al* (2006) ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature* 442(7098): 96-99
- Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA and Casero RA (2004) Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119(7): 941-953
- Shi YJ, Matson C, Lan F, Iwase S, Baba T and Shi Y (2005) Regulation of LSD1 histone demethylase activity by its associated factors. *Mol Cell* 19(6): 857-864
- Shin S and Janknecht R (2007) Activation of androgen receptor by histone demethylases JMJD2A and JMJD2D. *Biochem Biophys Res Commun* 359(3): 742-746
- Sims RJ, 3rd, Millhouse S, Chen CF, Lewis BA, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Manley JL and Reinberg D (2007) Recognition of trimethylated histone H3 lysine 4 facilitates the recruitment of transcription postinitiation factors and pre-mRNA splicing. *Mol Cell* 28(4): 665-676
- Smith BC and Denu JM (2009) Chemical mechanisms of histone lysine and arginine modifications. *Biochim Biophys Acta* 1789(1): 45-57
- Soares LM and Buratowski S (2013) Histone Crosstalk: H2Bub and H3K4 Methylation. *Mol Cell* 49(6): 1019-1020
- Spies N, Nielsen CB, Padgett RA and Burge CB (2009) Biased chromatin signatures around polyadenylation sites and exons. *Mol Cell* 36(2): 245-254
- Stefanovsky VY, Pelletier G, Hannan R, Gagnon-Kugler T, Rothblum LI and Moss T (2001) An immediate response of ribosomal transcription to growth factor stimulation in mammals is mediated by ERK phosphorylation of UBF. *Mol Cell* 8(5): 1063-1073
- Stewart GS, Panier S, Townsend K, Al-Hakim AK, Kolas NK, Miller ES, Nakada S, Ylanko J, Olivarius S, Mendez M *et al* (2009) The RIDDLE syndrome protein mediates a ubiquitin-dependent signaling cascade at sites of DNA damage. *Cell* 136(3): 420-434

- Stielow C, Stielow B, Finkernagel F, Scharfe M, Jarek M and Suske G (2014) SUMOylation of the polycomb group protein L3MBTL2 facilitates repression of its target genes. *Nucleic Acids Res* 42(5): 3044-3058
- Strohner R, Nemeth A, Jansa P, Hofmann-Rohrer U, Santoro R, Langst G and Grummt I (2001) NoRC-- a novel member of mammalian ISWI-containing chromatin remodeling machines. *EMBO J* 20(17): 4892-4900
- Suto RK, Clarkson MJ, Tremethick DJ and Luger K (2000) Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z. *Nat Struct Biol* 7(12): 1121-1124
- Suzuki MM and Bird A (2008) DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet* 9(6): 465-476
- Tahiliani M, Mei P, Fang R, Leonor T, Rutenberg M, Shimizu F, Li J, Rao A and Shi Y (2007) The histone H3K4 demethylase SMCX links REST target genes to X-linked mental retardation. *Nature* 447(7144): 601-605
- Takahashi Y, Rayman JB and Dynlacht BD (2000) Analysis of promoter binding by the E2F and pRB families in vivo: distinct E2F proteins mediate activation and repression. *Genes Dev* 14(7): 804-816
- Takeda S, Chen DY, Westergard TD, Fisher JK, Rubens JA, Sasagawa S, Kan JT, Korsmeyer SJ, Cheng EH and Hsieh JJ (2006) Proteolysis of MLL family proteins is essential for caspase-1-orchestrated cell cycle progression. *Genes Dev* 20(17): 2397-2409
- Tanaka Y, Okamoto K, Teye K, Umata T, Yamagiwa N, Suto Y, Zhang Y and Tsuneoka M (2010) JmjC enzyme KDM2A is a regulator of rRNA transcription in response to starvation. *EMBO J* 29(9): 1510-1522
- Tang L, Nogales E and Ciferri C (2010) Structure and function of SWI/SNF chromatin remodeling complexes and mechanistic implications for transcription. *Prog Biophys Mol Biol* 102(2-3): 122-128
- Tardat M, Brustel J, Kirsh O, Lefevbre C, Callanan M, Sardet C and Julien E (2010) The histone H4 Lys 20 methyltransferase PR-Set7 regulates replication origins in mammalian cells. *Nat Cell Biol* 12(11): 1086-1093
- Taubert S, Gorrini C, Frank SR, Parisi T, Fuchs M, Chan HM, Livingston DM and Amati B (2004) E2F-dependent histone acetylation and recruitment of the Tip60 acetyltransferase complex to chromatin in late G1. *Mol Cell Biol* 24(10): 4546-4556
- Taverna SD, Li H, Ruthenburg AJ, Allis CD and Patel DJ (2007) How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nat Struct Mol Biol* 14(11): 1025-1040
- Tessarz P and Kouzarides T (2014) Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15(11): 703-708
- Tollervey JR and Lunyak VV (2012) Epigenetics: judge, jury and executioner of stem cell fate. *Epigenetics* 7(8): 823-840

- Trojer P, Zhang J, Yonezawa M, Schmidt A, Zheng H, Jenuwein T and Reinberg D (2009) Dynamic Histone H1 Isozyme 4 Methylation and Demethylation by Histone Lysine Methyltransferase G9a/KMT1C and the Jumonji Domain-containing JMJD2/KDM4 Proteins. *J Biol Chem* 284(13): 8395-8405
- Tyagi S, Chabes AL, Wysocka J and Herr W (2007) E2F activation of S phase promoters via association with HCF-1 and the MLL family of histone H3K4 methyltransferases. *Mol Cell* 27(1): 107-119
- Tzatsos A, Paskaleva P, Ferrari F, Deshpande V, Stoykova S, Contino G, Wong KK, Lan F, Trojer P, Park PJ *et al* (2013) KDM2B promotes pancreatic cancer via Polycomb-dependent and -independent transcriptional programs. *J Clin Invest* 123(2): 727-739
- Vakoc CR, Mandat SA, Olenchok BA and Blobel GA (2005) Histone H3 lysine 9 methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Mol Cell* 19(3): 381-391
- van Leeuwen F, Gafken PR and Gottschling DE (2002) Dot1p modulates silencing in yeast by methylation of the nucleosome core. *Cell* 109(6): 745-756
- van Oevelen C, Wang J, Asp P, Yan Q, Kaelin WG, Jr., Kluger Y and Dynlacht BD (2008) A role for mammalian Sin3 in permanent gene silencing. *Mol Cell* 32(3): 359-370
- Van Rechem C, Black JC, Boukhali M, Aryee MJ, Graslund S, Haas W, Benes CH and Whetstine JR (2015) Lysine Demethylase KDM4A Associates with Translation Machinery and Regulates Protein Synthesis. *Cancer Discov*
- Vandromme M, Chailleux C, Escaffit F and Trouche D (2008) Binding of the retinoblastoma protein is not the determinant for stable repression of some E2F-regulated promoters in muscle cells. *Mol Cancer Res* 6(3): 418-425
- Vaquero A, Scher M, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Serrano L and Reinberg D (2007) SIRT1 regulates the histone methyl-transferase SUV39H1 during heterochromatin formation. *Nature* 450(7168): 440-444
- Vaute O, Nicolas E, Vandel L and Trouche D (2002) Functional and physical interaction between the histone methyl transferase Suv39H1 and histone deacetylases. *Nucleic Acids Res* 30(2): 475-481
- Vermeulen M, Mulder KW, Denisov S, Pijnappel WW, van Schaik FM, Varier RA, Baltissen MP, Stunnenberg HG, Mann M and Timmers HT (2007) Selective anchoring of TFIID to nucleosomes by trimethylation of histone H3 lysine 4. *Cell* 131(1): 58-69
- Verrier L, Escaffit F, Chailleux C, Trouche D and Vandromme M (2011a) A new isoform of the histone demethylase JMJD2A/KDM4A is required for skeletal muscle differentiation. *PLoS Genet* 7(6): e1001390
- Verrier L, Vandromme M and Trouche D (2011b) Histone demethylases in chromatin cross-talks. *Biol Cell* 103(8): 381-401
- Wagner EJ and Carpenter PB (2012) Understanding the language of Lys36 methylation at histone H3. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(2): 115-126

- Wang J, Hevi S, Kurash JK, Lei H, Gay F, Bajko J, Su H, Sun W, Chang H, Xu G *et al* (2009) The lysine demethylase LSD1 (KDM1) is required for maintenance of global DNA methylation. *Nat Genet* 41(1): 125-129
- Wang Y, Wysocka J, Sayegh J, Lee YH, Perlin JR, Leonelli L, Sonbuchner LS, McDonald CH, Cook RG, Dou Y *et al* (2004) Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylation. *Science* 306(5694): 279-283
- Wang Z, Zang C, Rosenfeld JA, Schones DE, Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Peng W, Zhang MQ *et al* (2008) Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nat Genet* 40(7): 897-903
- Webby CJ, Wolf A, Gromak N, Dreger M, Kramer H, Kessler B, Nielsen ML, Schmitz C, Butler DS, Yates JR, 3rd *et al* (2009) Jmjd6 catalyses lysyl-hydroxylation of U2AF65, a protein associated with RNA splicing. *Science* 325(5936): 90-93
- Wei Y, Yu L, Bowen J, Gorovsky MA and Allis CD (1999) Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell* 97(1): 99-109
- Westendorp B, Mokry M, Groot Koerkamp MJ, Holstege FC, Cuppen E and de Bruin A (2012) E2F7 represses a network of oscillating cell cycle genes to control S-phase progression. *Nucleic Acids Res* 40(8): 3511-3523
- Wilson JR (2007) Targeting the JMJD2A histone lysine demethylase. *Nat Struct Mol Biol* 14(8): 682-684
- Wissmann M, Yin N, Muller JM, Greschik H, Fodor BD, Jenuwein T, Vogler C, Schneider R, Gunther T, Buettner R *et al* (2007) Cooperative demethylation by JMJD2C and LSD1 promotes androgen receptor-dependent gene expression. *Nat Cell Biol* 9(3): 347-353
- Wong PP, Miranda F, Chan KV, Berlato C, Hurst HC and Scibetta AG (2012) Histone demethylase KDM5B collaborates with TFAP2C and Myc to repress the cell cycle inhibitor p21(cip) (CDKN1A). *Mol Cell Biol* 32(9): 1633-1644
- Xie L, Pelz C, Wang W, Bashar A, Varlamova O, Shadle S and Impey S (2011) KDM5B regulates embryonic stem cell self-renewal and represses cryptic intragenic transcription. *EMBO J* 30(8): 1473-1484
- Xie W, Ling T, Zhou Y, Feng W, Zhu Q, Stunnenberg HG, Grummt I and Tao W (2012) The chromatin remodeling complex NuRD establishes the poised state of rRNA genes characterized by bivalent histone modifications and altered nucleosome positions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(21): 8161-8166
- Yang M, Gocke CB, Luo X, Borek D, Tomchick DR, Machius M, Otwinowski Z and Yu H (2006) Structural basis for CoREST-dependent demethylation of nucleosomes by the human LSD1 histone demethylase. *Mol Cell* 23(3): 377-387
- Yang XJ and Seto E (2007) HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene* 26(37): 5310-5318

- Yuan X, Feng W, Imhof A, Grummt I and Zhou Y (2007) Activation of RNA polymerase I transcription by cockayne syndrome group B protein and histone methyltransferase G9a. *Mol Cell* 27(4): 585-595
- Zegerman P, Canas B, Pappin D and Kouzarides T (2002) Histone H3 lysine 4 methylation disrupts binding of nucleosome remodeling and deacetylase (NuRD) repressor complex. *J Biol Chem* 277(14): 11621-11624
- Zeng L, Zhang Q, Li S, Plotnikov AN, Walsh MJ and Zhou MM (2010) Mechanism and regulation of acetylated histone binding by the tandem PHD finger of DPF3b. *Nature* 466(7303): 258-262
- Zentner GE, Saiakhova A, Manaenkov P, Adams MD and Scacheri PC (2011) Integrative genomic analysis of human ribosomal DNA. *Nucleic Acids Res* 39(12): 4949-4960
- Zhan L, Huang C, Meng XM, Song Y, Wu XQ, Miu CG, Zhan XS and Li J (2014) Promising roles of mammalian E2Fs in hepatocellular carcinoma. *Cell Signal* 26(5): 1075-1081
- Zhang D, Yoon HG and Wong J (2005) JMJD2A is a novel N-CoR-interacting protein and is involved in repression of the human transcription factor achaete scute-like homologue 2 (ASCL2/Hash2). *Mol Cell Biol* 25(15): 6404-6414
- Zhang X, Bolt M, Guertin MJ, Chen W, Zhang S, Cherrington BD, Slade DJ, Dreyton CJ, Subramanian V, Bicker KL *et al* (2012) Peptidylarginine deiminase 2-catalyzed histone H3 arginine 26 citrullination facilitates estrogen receptor alpha target gene activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(33): 13331-13336
- Zhao J, Yuan X, Frodin M and Grummt I (2003) ERK-dependent phosphorylation of the transcription initiation factor TIF-IA is required for RNA polymerase I transcription and cell growth. *Mol Cell* 11(2): 405-413
- Zhao LJ, Subramanian T, Vijayalingam S and Chinnadurai G (2014) CtBP2 proteome: Role of CtBP in E2F7-mediated repression and cell proliferation. *Genes Cancer* 5(1-2): 31-40
- Zhou W, Zhu P, Wang J, Pascual G, Ohgi KA, Lozach J, Glass CK and Rosenfeld MG (2008) Histone H2A monoubiquitination represses transcription by inhibiting RNA polymerase II transcriptional elongation. *Mol Cell* 29(1): 69-80
- Zhou Y, Santoro R and Grummt I (2002) The chromatin remodeling complex NoRC targets HDAC1 to the ribosomal gene promoter and represses RNA polymerase I transcription. *EMBO J* 21(17): 4632-4640
- Zhou Y, Schmitz KM, Mayer C, Yuan X, Akhtar A and Grummt I (2009) Reversible acetylation of the chromatin remodelling complex NoRC is required for non-coding RNA-dependent silencing. *Nat Cell Biol* 11(8): 1010-1016
- Zhu Y, van Essen D and Sacconi S (2012) Cell-type-specific control of enhancer activity by H3K9 trimethylation. *Mol Cell* 46(4): 408-423
- Zhu Z, Wang Y, Li X, Xu L, Wang X, Sun T, Dong X, Chen L, Mao H, Yu Y *et al* (2010) PHF8 is a histone H3K9me2 demethylase regulating rRNA synthesis. *Cell Res* 20(7): 794-801

## **Annexes**

## **Annexe 1 : Article en révision**

The histone demethylase JMJD2A/KDM4A links nutrients/growth factors availability and  
ribosomal RNA transcription.

Kader Salifou <sup>1,2,§</sup>, Swagat Ray<sup>3,4,§</sup>, Laure Verrier<sup>1,2</sup>, Marion Aguirrebengoa<sup>1,2</sup>, Didier  
Trouche<sup>1,2</sup>, Konstantin I. Panov<sup>3,5,&,\*</sup>, Marie Vandromme<sup>1,2,&,\*</sup>

<sup>1</sup> Université de Toulouse ; UPS ; LBCMCP ; F-31062 Toulouse, France

<sup>2</sup> CNRS ; LBCMCP ; F-31062 Toulouse, France

<sup>3</sup> School of Biological Sciences, <sup>5</sup>the Centre for Cancer Research and Cell Biology, The  
Queen's University Belfast, Belfast, BT9 7BL, UK.

<sup>4</sup> Current address: School of Biological Sciences, University of Warwick, Coventry, CV4  
7AL, UK.

\*Corresponding authors; E-mail: k.panov@qub.ac.uk, Phone: +442890972119 and

E-mail: marie.vandromme@univ-tlse3.fr, Phone: +33561558111

& or § These authors have contributed equally to this work.

Running title: KDM4A role in activation of Pol-I transcription



## Abstract

**The interplay between methylation and demethylation of histone lysine residues is an essential component of gene expression regulation and there is considerable interest in elucidating the roles of proteins involved. We report that histone demethylase KDM4A/JMJD2A, which is involved in the regulation of cell proliferation and is over-expressed in some cancers, interacts with RNA Polymerase I, associates with active rRNA genes and is required for serum-induced activation of rDNA transcription. KDM4A controls the initial stages of transition from “poised”, non-transcribed rDNA chromatin into its active form. We show that PI3K, a major signaling transducer central for cell proliferation and survival and deregulated in many cancers, controls cellular localization of KDM4A and consequently its association with rDNA through the PDK1/SGK1 downstream kinases. We propose that the interplay between PI3K/PDK1/SGK1 signalling cascade and KDM4A constitutes a novel mechanism by which cells adapt ribosome biogenesis level to the availability of growth factors and nutrients.**

Eukaryotic genomic DNA, in a complex with histone proteins, is organized into a densely packed DNA-protein complex called chromatin, which harbours different levels of structural complexity and hierarchy <sup>1</sup>. Chromatin structure regulates DNA accessibility and therefore modulates the activity of enzymatic complexes requiring access to DNA. These complexes are involved in major cellular processes such as transcription, replication and DNA repair. Chromatin architecture is dynamic and regulated by DNA methylation <sup>2</sup>, chromatin remodelers <sup>3</sup> and various histone modifications <sup>4</sup>. These epigenetic modifications play crucial roles in determining cell fate and the cellular response to external and internal stimuli.

The basic unit of chromatin is the nucleosome composed of 146 bp of DNA wrapped around an octamer of histones (2 copies of each histone H2A, H2B, H3 and H4). Post-translational

modifications of histones such as acetylation, phosphorylation or methylation are central in the regulation of chromatin structure. Histone modifications are reversible through the action of enzymes carrying antagonist activities. One of the key components of epigenetic regulation of transcription is the balance between methylation and demethylation of lysine residues in histones. Enzymes methylating specific lysines (lysine methyl transferases, KMTs) and enzymes removing methyl groups from specific lysines (histone demethylases, KDMs) are highly specific for given lysine residues. Many lysine residues in histones H3 and H4 can be mono- (me), di- (me<sub>2</sub>) or trimethylated (me<sub>3</sub>), including lysine 9 (K9), lysine 36 (K36) and lysine 4 (K4) on H3. H3K9 methylation is enriched in heterochromatin and is associated with the promoters of repressed genes in euchromatin. By contrast, methylation of H3K4 at the promoter, or H3K36 in the coding region mark active genes in euchromatin.

rDNA encodes the pre-45S precursor of the 28S, 18S and 5S rRNA that are the main RNA components of ribosomes. Transcription of ribosomal RNA (rRNA) genes by RNA Polymerase I (Pol-I) is a key stage of ribosome biogenesis is directly linked to cell growth and proliferation and is regulated by a variety of signaling cascades including PI3K, mTOR and MAPK pathways <sup>5-7</sup>. Eukaryotic genomes contain a large number of rDNA repeats (in humans ~350 copies) described to exist in three distinct chromatin states: epigenetically silenced heterochromatin which is maintained throughout the life of a cell, and two different forms of transcriptionally competent euchromatin: non-transcribed, “closed” chromatin and actively transcribed “open” chromatin <sup>8-10</sup>. The currently accepted model of rDNA transcription regulation in higher eukaryotes suggests that the number of epigenetically silenced rDNA genes is maintained during a normal cell cycle, but it can be modified during development, differentiation and disease <sup>11-13</sup>. The euchromatic rDNA copies are those subjected to transcriptional regulation in response to routine variations in external conditions (e.g. nutrients, growth factors, stresses), to link rRNA synthesis to environmental conditions. The efficiency of rRNA synthesis at these “euchromatic” copies is regulated by a combination of two non exclusive mechanisms: through the alteration of the rate of

transcription and of Pol-I density and through epigenetic mechanisms that allow the passage from the closed to open chromatin states, such as post-translational modifications of histones and the re-positioning of nucleosomes<sup>10, 14-16</sup>. However, how chromatin architecture is controlled by growth factors/nutrients is still poorly understood despite continued efforts.

In this manuscript, we report the involvement of the histone demethylase KDM4A in the regulation of rDNA transcription. As a member of the KDM4 family, KDM4A (also called JMJD2A or JHDM3A) is specific for H3K9me2/3 and H3K36me2/3<sup>17, 27</sup>. Previous studies showed that KDM4A influences cell cycle progression and cell proliferation either through transcriptional control of key regulators of the cell cycle or by regulating replication timing<sup>18, 19</sup>. Interestingly, it was recently shown that KDM4A also regulates protein translation in the cytosol [\[Van Rechem, 2015 #3866\]](#). Here, we describe a novel role of KDM4A as a growth factor/nutrients-dependent regulator of rDNA transcription. Importantly, we discovered that the PI3K/PDK1/SGK1 signaling cascade, which is activated by growth factor/nutrients, is involved in the recruitment of KDM4A to the nucleolus. These results highlight the key role of KDM4A in the processes that regulate cell growth and proliferation.

## Results

### KDM4A is a nucleolar protein and associates with rDNA

KDM4A subcellular localization was determined in growing U2OS cells by indirect immunofluorescence using an antibody directed against the c-terminal part of KDM4A (anti-KDM4A-Ab1, **Fig. 1A**). As expected, KDM4A was found in the nucleus. Interestingly, inside the nucleus, the staining was not uniform and we observed that darker zones of DAPI, which correspond to nucleoli, exhibited a brighter staining. Moreover, KDM4A co-localized with the largest subunit of Pol-I (A194, **Fig. 1A**) and other nucleolar proteins (fibrillarin or UBF, a Pol-I transcription factor (**Fig. S1A**)). Importantly, a similar pattern was also observed using a

second antibody directed against the N-terminal part of KDM4A (anti KDMA-Ab2, **Fig. S1B**), indicating that the signal is indeed specific to KDM4A and not due to any cross-reaction with another protein. Note that this nucleolar localization was observed both by classical immunofluorescence (**Fig. S1B**) or following extraction of soluble proteins by triton treatment prior to fixation (**Fig. 1A** and **Fig. S1A**), indicating that KDM4A is tightly bound inside the nucleolus.

Similar results were observed in other cells, such as transformed cell lines (HeLa, GC92) or primary fibroblasts (WI38) (**Fig. S2A**). Noticeably, by contrast to KDM4A, the histone demethylase LSD1 was excluded from the nucleolus of U2OS cells (**Fig. S2B**), indicating that nucleoli accumulation is not a general feature of KDMs.

Nucleoli are the sites of rDNA transcription driven by RNA Polymerase I. rDNA genes, which encode the pre-45S rRNA precursor are present in multiple copies in the human genome (>300 copies) and localize inside the nucleoli during interphase. Considering that KDM4A is a chromatin modifier, we next tested its association with rDNA. We performed ChIP experiments using chromatin from growing U2OS cells and analysed KDM4A occupancy at various regions from the rDNA repeats by qPCR (**Fig. 1B, C**). We observed a strong enrichment of rDNA promoter regions in ChIPs performed using two different KDM4A-specific antibodies, and a low enrichment of other rDNA regions (transcribed, terminator and intergenic regions, (**Fig. 1C**, see **Fig. S3** for raw data of all ChIP experiments), indicating that KDM4A is specifically associated with the rDNA promoter in growing U2OS cells. This specific association led us to test whether KDM4A can interact with the Pol-I transcription machinery. We immunoprecipitated endogenous KDM4A from U2OS nuclear extracts and analysed immunoprecipitated complex by Western blotting using antibodies specific to the large subunit of Pol-I (A194), Pol-I specific transcription factor (UBF) and two subunits of Pol-I promoter recognition factor SL1 (TAF<sub>110</sub> and TAF<sub>63</sub>). We found that Pol-I, but not UBF or SL1, co-precipitated with KDM4A, demonstrating that endogenous KDM4A and Pol-I are present within the same multimolecular complex (**Fig. 1D**).

Altogether, these results show that KDM4A is a nucleolar protein that interacts with Pol-I and associates with the rDNA promoter, suggesting that it may play a role in regulating rDNA transcription.

### **KDM4A is required for efficient serum driven activation of rRNA synthesis**

rDNA transcription is tightly regulated by the supply in growth factors and nutrients which impact on the energy status of the cell and regulate intracellular metabolites levels <sup>20</sup>. Serum contains both growth factors and nutrients and, as a consequence, rRNA production is repressed upon serum deprivation and re-activated upon serum addition. This serum-dependent regulation of rDNA transcription is associated with chromatin remodelling and changes in histone modifications (for latest review see: <sup>21</sup>).

We thus tested the effect of KDM4A depletion on *de-novo* rRNA synthesis in starved-refed cells. Serum starved cells were transfected with a siRNA directed against KDM4A or a non-targeting siRNA as a control prior to stimulation by serum (see **Fig. S4** for siRNA efficiency) and rRNA expression was analysed by <sup>3</sup>H-Uridine labelling at different times following serum addition (**Fig. 2A**). As expected, the expression of 45S pre-RNA transcripts was activated following serum stimulation in control cells. However, this activation was significantly reduced in KDM4A depleted cells (**Fig. 2B, C**), demonstrating that KDM4A is important for serum-induced activation of the 45S pre-rRNA production. A similar result was also observed when rRNA expression was assessed in individual cells by metabolic labelling with 5-Fluorouridine (5-FUrd) (**Fig. 2D-F**). Notably, three different siRNA were used in these experiments, ruling out any off-target effects of siRNAs. Importantly, we found that KDM4A depletion did not affect the expression of UBF and Pol-I (**Fig. S4B**) suggesting a direct role of KDM4A in the regulation of rRNA synthesis.

All together, these results demonstrate that KDM4A is important for Pol-I driven transcription of rDNA in response to serum.

### **KDM4A stability, nucleolar localization and association with rDNA is regulated by nutrients/growth factors**

We next analysed KDM4A behaviour in starved and starved-refed cells. U2OS cells were serum starved and refed with serum as in **Fig. 2** and RNA isolated from starved and refed cells were analysed by RT-qPCR (**Fig. S5A**). As expected, the levels of the 45S-preRNA increased following serum addition. However, no significant changes were observed in the mRNA levels of KDM4A, KDM4B or KDM4C histone demethylases. At the protein level, we observed a reproducible increase in KDM4A protein levels (by approximately two fold) upon serum addition, which was due to increased stability of KDM4A (**Fig. S5B and C**).

We also analysed KDM4A cellular localization in starved and starved-refed cells at two different time points after serum addition. We found that in starved cells, KDM4A largely lost its nucleolar localisation, which was rapidly restored following serum addition (**Fig. 3A**), indicating that KDM4A is relocalized to the nucleoli in response to serum. We next tested if KDM4A-rDNA association is also regulated by serum using ChIP approach. We found that in starved cells association of KDM4A with the rDNA promoter was nearly abolished (**Fig. 3B**). However, it was restored as soon as 30 min after serum addition at a level that remained constant for 1 hour. Importantly, such a serum-induced recruitment of KDM4A is specific to rDNA, since on a Pol-II-regulated target of KDM4A, the CDC6 promoter, binding of KDM4A was unchanged upon serum stimulation (**Fig. 3C**). Importantly, KDM4A association with DNA is limited to the specific *loci* and not detected at non-KDM4A dependent genes (**Fig. 3C**). Thus, the increase of KDM4A occupancy at the rDNA is not a mere consequence of the global increase in KDM4A level but reflects the functional importance of the serum-dependent regulation of KDM4A nucleolar localisation.

Interestingly, and by contrast to what we observed in growing cells (**Fig. 1C**), KDM4A was transiently recruited to the transcribed region of rDNA following serum stimulation, suggesting that KDM4A can have targets outside the promoter. These results are consistent

with our finding of a physical interaction between Pol-I and KDM4A (see **Fig. 1D**), since Pol-I is present upon serum addition on both the rDNA promoter and the coding region <sup>24</sup> (**Fig. S6A**).

Taken together, these data indicate that the nucleolar localisation of KDM4A and its association with rDNA are controlled by growth factor/nutrients-dependent mechanisms.

### **PI3K pathway controls nucleolar recruitment of KDM4A**

PI3K, MAPK and mTOR pathways are three main pathways involved in the regulation of rDNA transcription in response to environmental cues <sup>5-7</sup>. We thus intended to characterize the role of these pathways in the control of KDM4A nucleolar localisation. We treated cells with specific inhibitors of these kinases prior to serum stimulation and examined cellular localization of KDM4A and level of nascent rRNA synthesis (by 5-FUrd incorporation). The efficiency of inhibitors for their capacity to block phosphorylation of specific downstream targets was controlled by Western-blot (**Fig. S7**). As expected we found that all inhibitors affected 5-FUrd incorporation and therefore rRNA synthesis at various levels (**Fig. 4A, B**, column 2 and **C**). However, only the PI3K inhibitors (LY29002 and PI-103), but not MEK/MAPKK (PD98059) or mTOR (Rapamycin) inhibitors, prevented the accumulation of KDM4A in the nucleolus upon serum addition (**Fig. 4A, B**, column 1, see **Fig. S8** for the effects of these inhibitors in serum deprived cells). Importantly, overexpression of wild type PTEN, a PI3P phosphatase and as such a specific inhibitor of the PI3K pathway, but not of an enzymatically defective PTEN, also blocked KDM4A relocalization to the nucleolus (**Fig. 4D**), further demonstrating the involvement of the PI3K pathway in this subnuclear distribution of KDM4A.

The inhibition of MAPK or mTOR pathways affects 5-FUrd incorporation and therefore rDNA transcription to a lesser extent than the inhibition of PI3K pathway (**Fig. 4A**, column 2 and **C**). Thus, the loss of KDM4A localisation followed by PI3K inhibition could be an indirect

effect of severe repression of Pol-I transcription. To rule out this hypothesis, we combined the inhibition of the MAPK and mTOR pathways, which are known to cooperate in the serum induced activation of rDNA transcription<sup>25</sup>. Such a treatment led to a blockage of rRNA production nearly as efficient as inhibition of PI3K pathway (**Fig. 4A**, column 2 and **C**). Nevertheless, it still had no effect on KDM4A localisation (**Fig. 4A**, column 1). Thus, PI3K is the master regulator of KDM4A recruitment to the nucleoli.

Strikingly, this effect is independent on the classical PI3K-Akt pathway, since inhibition of Akt, a kinase activated by PI3K phospholipids products did not impede KDM4A relocalization to the nucleoli in response to serum (**Fig. 4B**, column 1), despite having a major inhibitory effect on rDNA transcription (**Fig. 4B**, column 2). We thus investigated the pathway downstream of PI3K, which could be important for KDM4A relocalization. Chemical inhibition of the PDK1, a major PI3K target {Vanhaesebroeck, 2000 #3864}, as well as its downstream kinase SGK1 {Lang, 2010 #3865} efficiently blocked KDM4A accumulation in the nucleolus (**Fig. 5A, B, columns 1**, see **Fig. S7** for western blots monitoring the efficiency of these inhibitors). To confirm the involvement of SGK1 kinase, we inhibited its expression using two independent siRNAs (see **Fig. S7** for their validation), and we found that these two siRNAs efficiently blocked KDM4A nucleolar accumulation (**Fig. 5C, column 1**). Importantly, these inhibitors and siRNAs also blocked rDNA transcription as shown by their effect on 5Furd incorporation (**Fig. S8**). We have summarised effect of inhibition/depletion of all investigated kinases on serum driven activation of rRNA synthesis and re-localisation of KDM4A in **Table 1**.

In summary, our results indicate that KDM4A accumulation in the nucleolus in response to serum stimulation is regulated by the PI3K/PDK1/SGK1 signaling cascade, which therefore controls the efficiency of activation of rRNA synthesis.

### **KDM4A favours rDNA transcription by demethylating H3K9**



We next investigated the mechanism by which KDM4A participates in rRNA synthesis upon serum-stimulation. We first tested whether KDM4A enzymatic activity is required for the regulation of Pol-I transcription by investigating the ability of wild type KDM4A or a KDM4A mutant (KDM4AH188A) defective for histone demethylase activity<sup>18</sup> to restore rDNA transcription in cells depleted from endogenous KDM4A. We transfected U2OS cells with siRNA targeting the 5' untranslated region of KDM4A (so that it did not silence the expression of recombinant KDM4A which does not contain the 5'UTR), and we found, as expected, that this siRNA affect efficiency of activation of rDNA transcription (**Fig. 6A**, column 2 and **B**). Strikingly, overexpression of wild type KDM4A prior to starvation and refeeding, but not of the enzymatic-defective KDM4A, efficiently restored rDNA transcription (**Fig. 6A and B**, see **Fig. S9A** for KDM4A expression). Moreover, in the absence of siRNA depletion of KDM4A, we observed that cells expressing inactive KDM4A exhibited decreased levels of rDNA transcription compare to wild type showing its dominant-negative effect (**Fig. S9B, C**).

These results indicate that KDM4A demethylase activity is required for efficient activation of rRNA synthesis and that the inactive KDM4A functions as a dominant negative mutant, suggesting the importance of changes in the methylation status of KDM4A substrates at rDNA genes.

The human genome contains more than 300 copies of rDNA repeats and the chromatin structure of these repeats is not uniform, rDNA genes being either hetero- or euchromatic<sup>21, 26</sup>. Our ChIP data showed that KDM4A is associated with rDNA and this association is regulated by serum (**Fig. 1C and Fig. 3B**). However, these experiments do not allow to distinguish heterochromatic and euchromatic rDNA. Thus, we next investigate whether KDM4A associated with a particular subpopulation of rDNA genes. To this goal, we first isolated rDNA associated with Pol-I, corresponding to euchromatic rDNA, by immunoprecipitating chromatin with antibodies specific to the core Pol-I subunit (second largest subunit A135). Indeed, according to previous results<sup>24</sup> and our data (**Fig. S6A**), a

significant fraction of Pol-I remains associated with rDNA promoter and transcribed regions in serum-starved cells which allows isolation of euchromatic rDNA. The Pol-I associated chromatin was next subjected to a second round of immunoprecipitation using antibodies specific to KDM4A as well as non-modified or modified histones. Using this sequential ChIP (sChIP) approach we detected a significant signal of rDNA promoter regions following KDM4A sChIP, confirming that KDM4A associates with the euchromatic pool of rDNA repeats (**Fig. 6C**).

This result stands in contrast to a previous report, which showed that Pol-I is mainly associated with the transcriptionally active pool of rDNA, and that its association is lost in starved cells <sup>10</sup>. In our hands, association of Pol-I with rDNA in various cell lines (U2OS, HeLa and MCF7) is only lost if the cells are under severe stress (i.e. at least 48 hours of serum deprivation) which is accompanied by changes in nucleolar morphology and by a significant decrease in cells viability (KP, unpublished data). Therefore, the most likely explanation for this discrepancy is the different sensitivity of various cells to metabolic stresses and/or differences in starvation regime.

We next investigated the dynamic of H3K9 methylation marks at the Pol-I-bound rDNA using sChIP approach in normal and KDM4A depleted cells. Since histone H3 occupancy at the rDNA gene changed during activation (**Fig. S6B, C**), signals obtained for methylated H3K9 marks were normalized to H3 signal. No specific signal could be observed for H3K9me2 at rDNA loci (**Fig. S3**). However, we found that the level of H3K9me3 occupancy at the transcriptionally competent rDNA decreased upon serum refeeding whereas H3K9me1 occupancy increased (**Fig. 6D, E**), correlating spatially and temporally with the association of KDM4A with rDNA (**Fig. 6C**). Importantly, siRNA mediated depletion of KDM4A prevented these changes (**Fig. 6 F, G**). We were unable to detect any enrichment in H3K36me3 (another known substrate of KDM4A) at euchromatic rDNA (**Fig. S3**).

Taken together, these results suggest that KDM4A specifically demethylates trimethylated H3K9 at the promoter and the transcribed regions of active rDNA repeats upon refeeding of starved cells and this demethylation plays an important role in the serum mediated activation of rDNA transcription.

### **KDM4A is dispensable for maintaining the steady-state levels of rDNA transcription**

Because KDM4A is recruited to the rDNA promoter in growing cells (**Fig. 1C**), we analyzed its involvement in Pol-I transcription in asynchronously growing cells. Neither siRNA-mediated knockdown of KDMA4 (**Fig. 7A, B**) nor overexpression of a demethylase defective mutant (**Fig. 7D, E**) (working as a dominant negative mutant in starved-refed conditions, see above) had major effects on the level of rDNA transcription in growing U2OS cells (**Fig. 7B and E**) or on U2OS cells proliferation (**Fig. 7C**). Thus, although KDM4A is still associated with rDNA promoter in growing cells suggesting a potential role for this enzyme, it does not seem to be important for efficient rDNA transcription. We cannot rule out the possibility that combination of low requirements for KDM4A in growing cell and less than 100% efficiency of siRNA mediated depletion and endogenous KDM4A inhibition led to the apparent lack of the effects of KDM4A siRNA and dominant negative mutant overexpression in growing cells. Nevertheless, these findings suggest that KDM4A is largely dispensable for the maintenance of rDNA repeats transcription but specifically required for their activation in response to serum by allowing the transition from poised to actively transcribed states.

## **Discussion**

### **KDM4A is important for sustained activation of rDNA transcription**

Here, we present evidence that KDM4A is important for serum-induced activation of rDNA transcription, since (i) depletion of KDM4A by specific siRNAs leads to the decrease of

serum-stimulated rRNA synthesis observed both at the cell population levels and in individual cells (**Fig. 2**); (ii) this effect is complemented by the expression of siRNA-insensitive recombinant KDM4A (**Fig. 6**); and (iii) KDM4A is recruited to the rDNA during transcriptional activation (**Fig. 3** and **6**). Notably, KDM4A is not essential for rDNA transcription: quantitative experiments relying on metabolic labelling indicate that KDM4A depletion resulted in a two to three fold decrease in serum-induced rDNA transcription (**Fig. 2**). Moreover, serum starved cells readily transcribe rDNA despite we did not find any evidence for KDM4A presence at the rDNA promoter (**Fig. 3B**). Furthermore, depletion of KDM4A from normally growing cells has no major effect of rDNA transcription level (**Fig. 7**). Thus, these data imply that KDM4A is required for efficient activation of rDNA transcription when cells have to recover a full level of rRNA production after experiencing unfavourable growth conditions (starvation in our case). However, this role is still very important, since even 50 % reduction in rDNA transcription would have a significant impact on the capacity of cells to grow and divide (we have preliminary evidence from several approaches to suggest that ~50% decrease in Pol-I transcription can slow cell proliferation up to 6 – 7 fold). Furthermore, it has been demonstrated that maintenance of elevated levels of Pol-I activity in cancer cells appears critically important for the process of malignant transformation and cancer cell survival, as e.g. a ~35% reduction in Pol-I transcription in E $\mu$ -Myc lymphoma cells resulted in induction of apoptosis as a consequence of immediate nucleolar stress, even before ribosome insufficiency takes effect on biosynthetic capacity {Bywater, 2012 #3534}.

### **KDM4A is specifically involved in the initial steps of rDNA activation**

Our data also bring important insights into the precise step of rDNA transcription which requires KDM4A. Recent studies have revealed that in mammals, rDNA chromatin exists in three different epigenetic states<sup>8-10, 15</sup>.

- Firstly, silent, heterochromatic rDNA repeats which are characterised by high level of DNA methylation and repressive histone marks (40-60% of all repeats in cancer cells).
- Secondly, poised, transcriptionally competent, euchromatic rDNA which is largely unmethylated and marked by hypoacetylated H3 and H4. The euchromatic poised rDNA genes harbour the bivalent marks H3K4me3 and H3K27me3, as well as tri-methylated H3K9 (<sup>10,15</sup> and this work). The so-called bivalent promoters are characteristic of genes that have to be quickly responsive to environmental cues, and have been first described for key development genes transcribed by Pol-II <sup>28</sup>. Interestingly, Pol-I is present at poised rDNA repeats prior stimulation upon environmental changes ({Ray, 2013 #3656} and our data)
- Thirdly, active, transcribed euchromatic rDNA which is also unmethylated and characterised by higher levels of H3 and H4 acetylation combined with euchromatic histone marks.

The ratio between heterochromatic and euchromatic repeats does not change during the cell cycle or in response to environmental stimuli <sup>13, 29</sup>, but can be altered during development or malignant transformation <sup>21</sup>. In contrast, the ratio between poised and transcribed rDNA repeats is regulated through epigenetic based mechanisms allowing the adaptation of rDNA transcription during the cell cycle or in response to metabolic and environmental conditions (serum starvation/refeeding in this study). Therefore, unfavourable growth conditions would lead to accumulation of poised rDNA repeats which are converted to their active form when conditions become more favourable. The molecular mechanisms that drive this conversion are not completely defined and one of the major advances of this work is the identification of KDM4A as an enzyme which is involved in the initial stages of chromatin “activation”.

This transition indeed requires conversion of H3K9me3 to H3K9Ac. Here we propose that initial stage of this conversion is controlled by KDM4A which is recruited to rDNA shortly after refeeding (**Fig. 3B** and **Fig. 6C**). KDM4A targets H3K9me3 (a known substrate of this enzyme) at the rDNA promoter, allowing its demethylation and activation of rDNA

transcription. The amount of H3K9me1 is inversely correlated to H3K9me3 upon KDM4A inhibition, indicating that KDM4A specifically target H3K9me3, converting it to H3K9me1. However, further conversion to unmethylated H3K9, allowing its acetylation, must take place. Strikingly, it has been shown that the histone demethylase PHF8/JHDM1F associates with transcribed rDNA and positively regulates transcription by targeting H3K9me2/1<sup>34, 35</sup>. We propose that KDM4A, at the initial stage of activation, removes H3K9me3 mark converting it to mono- or di-methylated K9, which can serve as substrates for PHF8, then allowing its acetylation and maximal activation of rDNA genes. In agreement with such a dynamic action of KDM4A and PHF8, both KDM4A and PHF8 bind to H3K4me3, the histone mark specific for active rDNA promoters<sup>34, 36</sup>, which may explain stable association of both enzymes with the promoter and only transient association of KMD4A with transcribed region of rDNA upon refeeding (**Fig. 3B**).

Our data thus suggest that KDM4A is important for the first round of transcription. However, it is probably dispensable for the subsequent rounds. Indeed, we observed only transient association of KDM4A with transcribed region of rDNA upon refeeding (**Fig. 3B**). Moreover, we found that KDM4A depletion has no major effect on rRNA synthesis in actively growing cells (**Fig. 7**). Therefore, at euchromatic rDNA, we observe a dynamic picture of ever-changing histone modifications which play an essential role in the flexibility of transcriptional regulation and the full complexity of which is still not entirely understood.

### **KDM4A is regulated by a PI3K-dependent signaling pathway**

Another exiting finding of this study is the discovery of a link between the control of the subcellular localisation of an enzyme involved in epigenetic control of transcription (KDM4A) and the activity of a signaling cascade regulated by the availability of nutrients and growth factors (PI3K).

Three major pathways (PI3K, mTOR and MAPK) are activated in response to nutrients/growth factors and known to regulate rDNA transcription <sup>7, 38, 39</sup>. PI3K is a prominent signaling cascade involved in control of cell growth, proliferation and survival and that is often up-regulated in various cancers <sup>40</sup>. PI3K is known to regulate Pol-I transcription alone or in conjunction with mTOR and MAPK pathways <sup>7, 25</sup>. Many signalling cascades including PI3K pathway, have been shown to target chromatin-modifying enzymes including histone demethylases (for reviews see: <sup>41, 42</sup>). Class II histone-deacetylases are well described examples of chromatin modifiers regulated through changes in their subcellular localization, shuttling from the cytoplasm to nucleus in response to environmental cues to regulate genes expression <sup>43</sup>. The question of how KMTs/KDMs are linked to signalling pathways is challenging and only few examples have been documented. KMTs/KDMs are targeted by signalling molecules inside the nucleus leading in changes in partner association, targeting to chromatin and/or substrate specificity <sup>44, 45</sup>. Here, we discovered that PI3K pathway (but not mTOR or MAPK pathways), through downstream kinases PDK1 and SGK1, controls KDM4A cellular localization and therefore its recruitment to rDNA. Inhibition of PI3K, PDK1 or SGK1 blocks KDM4A re-localization to nucleoli of re-fed cells affects the efficiency of activation of Pol-I transcription (**Fig. 4 and 5**). It represents to our knowledge the first example of the regulation of the intranuclear partition of a KDM between the nucleoplasm and the nucleolus, which is required to adapt rDNA transcription, and consequently ribosome biogenesis, to the availability of growth factors/nutrients. The PI3K signalling pathway is known to regulate rDNA transcription by targeting various components of Pol-I transcription machinery. It was described that upon serum/nutrients addition, it regulates both TIF-1A/RRN3 stability and nucleolar localization through Akt- mediated modulation of CK2 activity {Nguyen le, 2013 #3853}. PI3K was also described to directly regulate UBF through its protein kinase activity {Drakas, 2004 #3852} and regulate SL1 occupancy at the promoter {James, 2003 #1962}. PTEN, a negative regulator of the PI3K pathway was described to inhibit Pol-I transcription by disturbing the SL1 complex on rDNA, although the mechanism remains unclear {Zhang, 2005 #3867}. Our data add another

mechanism for the regulation of rDNA transcription by PI3K that takes place at the chromatin level through the regulation of KDM4A by PI3K/PDK1/SGK1 signalling cascade. Hence, the distinct routes converge controlling the activation of rDNA transcription (see model of the regulation of rDNA by PI3K in **Fig 8**)

What is the mechanism by which the PI3K/PDK1/SGK1 cascade favours nucleolar accumulation of KDM4A? Interestingly, we found that serum treatment led to increased stability of KDM4A and consequently its accumulation (**Fig. S5**). However, this is unlikely to be linked to KDM4A re-localization, since PI3K inhibition did not prevent the serum-induced increase in KDM4A level (**Fig. S5**) but blocks its nucleolar shuffling (**Fig. 4**). Thus, the PI3K/PDK1/SGK1 cascade regulates the affinity of KDM4A for the nucleolus, most probably by phosphorylating KDM4A (or its associated partner), thus facilitating its nucleolar translocation (see our model in **Fig. 8**). Clearly, further studies are required to determine how exactly PI3K/PDK1/SGK1 axis regulates KDM4A localization.

In conclusion, here we present evidence for a novel role of PI3K signaling in the regulation of epigenetic changes at the specific gene. PI3K acts through SGK1 by regulating the subcellular localization of histone demethylase KDM4A in response to serum. KDM4A moves inside the nucleolus to target trimethylated H3K9, leading to the activation of rDNA transcription. Interestingly, strong links have been uncovered between upregulation of Pol-I transcription or PI3K activity and cancer <sup>40</sup> and now we have established that KDM4A is targeted by PI3K pathway and controls activation of Pol-I transcription. Our results thus extend a general role of KDM4A in the regulation of protein synthesis and imply that KDM4A may be a very promising target in anticancer therapy.



### **Acknowledgements**

DT's team is supported by a grant from the ARC (Association de Recherche contre le Cancer) as a "Programme ARC". The authors would like to thank Olivier Gadal (University of Toulouse), Bob White (University of York) and Stefan Roberts (University of Bristol) for their critical reading of the manuscript and helpful suggestions.

**Author contributions:** K.S., S.R., L.V., M.A., K.I.P. and M.V. carried out the experiments. K.I.P. and M.V. conceived the project, designed the experiments, analyzed the data (with input from other authors) and, with the help of D.T., wrote the paper.

## References

- 1 C. L. Woodcock and R. P. Ghosh, *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2 (5), a000596 (2010).
- 2 J. K. Kim, M. Samaranayake, and S. Pradhan, *Cell Mol Life Sci* 66 (4), 596 (2009).
- 3 C. R. Clapier and B. R. Cairns, *Annual review of biochemistry* 78, 273 (2009).
- 4 A. J. Bannister and T. Kouzarides, *Cell research* 21 (3), 381 (2011).
- 5 J. Russell and J. C. Zomerdijs, *Trends Biochem Sci* 30 (2), 87 (2005).
- 6 T. Moss, F. Langlois, T. Gagnon-Kugler et al., *Cell Mol Life Sci* 64 (1), 29 (2007).
- 7 D. Drygin, W. G. Rice, and I. Grummt, *Annual review of pharmacology and toxicology* 50, 131 (2010).
- 8 B. McStay and I. Grummt, *Annual review of cell and developmental biology* (2008).
- 9 E. Sanij and R. D. Hannan, *Epigenetics* 4 (6) (2009).
- 10 W. Xie, T. Ling, Y. Zhou et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2012).
- 11 I. Grummt and C. S. Pikaard, *Nat Rev Mol Cell Biol* 4 (8), 641 (2003).
- 12 R. J. Lawrence and C. S. Pikaard, *Cell Cycle* 3 (7), 880 (2004).
- 13 E. Sanij, G. Poortinga, K. Sharkey et al., *The Journal of cell biology* 183 (7), 1259 (2008).
- 14 V. Stefanovsky and T. Moss, *Cell Cycle* 5 (7), 735 (2006).
- 15 A. Murayama, K. Ohmori, A. Fujimura et al., *Cell* 133 (4), 627 (2008).
- 16 Y. Tanaka, K. Okamoto, K. Teye et al., *Embo J* 29 (9), 1510 (2010).
- 17 R. J. Klose, E. M. Kallin, and Y. Zhang, *Nat Rev Genet* 7 (9), 715 (2006).
- 18 J. C. Black, A. Allen, C. Van Rechem et al., *Mol Cell* 40 (5), 736 (2010).
- 19 M. Kogure, M. Takawa, H. S. Cho et al., *Cancer letters* 336 (1), 76 (2013).
- 20 M. Shimobayashi and M. N. Hall, *Nat Rev Mol Cell Biol* 15 (3), 155 (2014).
- 21 I. Grummt and G. Langst, *Biochimica et biophysica acta* 1829 (3-4), 393 (2013).
- 22 M. K. Tan, H. J. Lim, and J. W. Harper, *Mol Cell Biol* 31 (18), 3687 (2011).

- 23 C. Van Rechem, J. C. Black, T. Abbas et al., *J Biol Chem* 286 (35), 30462 (2011).
- 24 S. Ray, T. Panova, G. Miller et al., *Nature communications* 4, 1598 (2013).
- 25 M. J. James and J. C. Zomerdijk, *J Biol Chem* (2003).
- 26 S. Hamperl, M. Wittner, V. Babl et al., *Biochimica et biophysica acta* 1829 (3-4), 405 (2013).
- 27 J. R. Whetstine, A. Nottke, F. Lan et al., *Cell* 125 (3), 467 (2006).
- 28 P. Voigt, W. W. Tee, and D. Reinberg, *Genes Dev* 27 (12), 1318 (2013).
- 29 V. Y. Stefanovsky, F. Langlois, D. Bazett-Jones et al., *Biochemistry* 45 (11), 3626 (2006).
- 30 A. Vaquero, M. Scher, H. Erdjument-Bromage et al., *Nature* 450 (7168), 440 (2007).
- 31 Z. C. Zhang, Y. Liu, S. F. Li et al., *Mol Cell Biol* (2014).
- 32 X. Yuan, W. Feng, A. Imhof et al., *Mol Cell* 27 (4), 585 (2007).
- 33 J. F. Couture, E. Collazo, P. A. Ortiz-Tello et al., *Nature structural & molecular biology* 14 (8), 689 (2007).
- 34 W. Feng, M. Yonezawa, J. Ye et al., *Nature structural & molecular biology* 17 (4), 445 (2010).
- 35 Z. Zhu, Y. Wang, X. Li et al., *Cell research* 20 (7), 794 (2010).
- 36 R. Cong, S. Das, I. Ugrinova et al., *Nucleic Acids Res* 40 (19), 9441 (2012).
- 37 M. Shen, T. Zhou, W. Xie et al., *PloS one* 8 (5), e62668 (2013).
- 38 D. Ruggero, *Science signaling* 5 (241), pe38 (2012).
- 39 N. Hein, K. M. Hannan, A. J. George et al., *Trends in molecular medicine* 19 (11), 643 (2013).
- 40 D. A. Fruman and C. Rommel, *Nat Rev Drug Discov* 13 (2), 140 (2014).
- 41 A. I. Badeaux and Y. Shi, *Nat Rev Mol Cell Biol* 14 (4), 211 (2013).
- 42 X. J. Yang and E. Seto, *Mol Cell* 31 (4), 449 (2008).
- 43 E. Verdin, F. Dequiedt, and H. G. Kasler, *Trends Genet* 19 (5), 286 (2003).
- 44 A. Baba, F. Ohtake, Y. Okuno et al., *Nat Cell Biol* 13 (6), 668 (2011).
- 45 Y. Liu, H. Yu, and S. D. Nimer, *Cell Cycle* 12 (2), 199 (2013).

- <sup>46</sup> R. Drakas, X. Tu, and R. Baserga, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (25), 9272 (2004).
- <sup>47</sup> D Thomas, JA Powell, BD Green et al., *PLoS biology* 11 (3) (2013).
- <sup>48</sup> V. Stefanovsky, F. Langlois, T. Gagnon-Kugler et al., *Mol Cell* 21 (5), 629 (2006).
- <sup>49</sup> X. T. Nguyen le and B. S. Mitchell, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110** (51), 20681 (2013).

## Figure Legends

### **Figure 1. KDM4A resides in nucleolus , associates with rDNA repeats and interacts with Pol-I.**

**A.** Actively growing U2OS cells (confluency 60-70%) were fixed following extraction with 1% Triton X100 and analyzed by indirect immunofluorescence using antibodies specific to human KDM4A (panel 1) and human Pol-I largest subunit A194 (panel 2); nuclear DNA was stained by DAPI (panel 3). Images were acquired with a Leica fluorescent microscope (DM5000- 20X objective). Representative nuclei are shown with associated merged images (panel 4). Bar = 5  $\mu$ M.

**B.** A diagram of the human rDNA repeat is shown indicating the positions of eight sets of specific PCR primer/probes used for qPCR analysis of immunoprecipitated DNA. 5'ETS – 5'-external transcribed spacer; IGS – intergenic spacer; Prom – the rRNA promoter, term – the terminator. Signal representing the transcribed region (TrR) is the average of the combined signal from 5'ETS, 18S, 5.8S and 28S rRNA. Signal representing the non transcribed region (nTrR) is the average of the combined signal from IGS1 and IGS2.

**C.** ChIP assays were performed using antibodies specific to human KDM4A from two different sources and analyzed by qPCR using eight sets of specific probes and primers derived from different regions of rDNA repeats (see the diagram above). The value of each bar represents the difference between the signals from the specific antibody and from the negative control (an appropriate IgG) expressed as % from total chromatin input . Signal representing the transcribed region (TrR) is the average of the combined signal from 5'ETS, 18S, 5.8S and 28S rRNA. Signal representing the non transcribed region (nTrR) is the average of the combined signal from IGS1 and IGS2. Standard deviations from three independent experiments are shown.

**D.** KDM4A was immunoprecipitated from nuclear extract of U2OS cells using KDM4 specific antibodies (Bethyl). Immunoprecipitated complexes were analysed by Western blotting using either antibodies specific to human Pol-I largest subunit A194 and UBF (lane 4), or to SL1 subunits TAF<sub>110</sub> and TAF<sub>63</sub> (lane 7). Input - lanes 1, 2 and 6, negative control (anti-HA antibodies) – lanes 3 and 8. Purified SL1 – lane 5

**Figure 2. KDM4A is required for efficient serum-driven activation of rRNA synthesis.**

**A.** Schematic representation of the labelling of cells with <sup>3</sup>H-uridine to determine the effect of KDM4A depletion on activation of rRNA synthesis. U2OS cells were transfected either with non-targeting (siScr) or KDM4A specific siRNA3 (siKDM4A3). 24 h post-transfection cells were starved. Transcription was activated by addition of serum and <sup>3</sup>H-uridine at time point 0.

**B.** RNA was extracted 15, 30, 60 and 90 min after serum addition and *de novo* rRNA transcripts were detected by tritium imaging of RNA blots (top panel) using X-ray film. Total 18S and 28S rRNAs were detected by ethidium bromide staining (bottom panel).

**C.** To determine the relative efficiencies of rRNA synthesis, RNA blots (similar to Fig. 2B experiment) were imaged using tritium image plate (Fuji) and quantitated with aid of phosphoimager (Fuji) and Aida software (Raytec). Transcript levels are indicated for 47S/45S pre-rRNA. The data are expressed as a percentage of the highest value (set at 100 %); standard deviations for three independent experiments are shown.

**D.** Schematic representation of the labelling of cells with 5-FUrd to determine the effect of KDM4A depletion on activation of rRNA synthesis in individual cells. U2OS cells were serum-starved for 16 hours, electroporated with either a non targeting siRNA (siScr) or two siRNAs directed against KDM4A (siA1 and siA2) and kept in serum free medium for further 24 hours before serum refeeding in the presence of 5-FUrd for 30 min.

**E.** Cells were stained for 5-FUrd incorporation using anti-BrdU antibodies. Nuclear DNA was stained with DAPI. Representative immunofluorescence images are shown. Bar=5  $\mu$ M.

**F.** Box-plot of the quantification of 5-FUrd staining per cell obtained using image J from the experiment shown in E; p-value (wilcoxon test)=\* $4.84 \times 10^{-11}$ , \*\* $6.12 \times 10^{-12}$ . Note the presence of many outliers in samples transfected by KDM4A siRNA, which most likely correspond to untransfected cells.

**Figure 3. Refeeding of starved cells led to KDM4A re-localization and re-association with rDNA .**

**A.** U2OS cells were serum starved for 24 hours (t=0) and refed with serum. Cells were fixed at 30 and 60 min following serum addition, and analyzed by indirect immunofluorescence using antibodies specific to human KDM4A (panel 1) and human Pol-I largest subunit A194 (panel 2); nuclear DNA was stained by DAPI (panel 3). Merged images are shown (panel 4). Bar = 5  $\mu$ M.

**B.** ChIP assays were performed using antibodies specific to human KDM4A and chromatin isolated from starved and starved-refed cells (30 and 60 min after serum addition) and analyzed as in **Fig.1C** to determine KDM4A binding to rDNA promoter (Pr), transcribed region (TrR) or non transcribed region (nTrT). The value of each bar represents the difference between the signals from the specific antibody and from the negative control (an appropriate IgG) expressed as % from total chromatin input (see **Fig. S3B** for raw data). Standard deviations from three independent experiments are shown.

**C.** ChIP assays were performed using antibodies specific to human KDM4A as in B and chromatin immunoprecipitated from starved and starved-refed cells (60 min after serum addition) were analyzed by qPCR for the presence either CDC6 or P0 and GAPDH promoters representing a positive and negative controls of the anti-KDM4A ChIP,

respectively. The value of each bar represents the difference between the signals from the specific antibody and from the negative control (an appropriate IgG) expressed as % from total chromatin input (see **Fig. S3C** for raw data). Standard deviations from three independent experiments are shown.

**Figure 4. PI3K pathway controls nucleolar localization of KDM4A.**

**A.** U2OS cells were serum starved for 24 hours. Starved cells were incubated for 30 min with MAPK inhibitor PD98059 (PD), mTOR inhibitor rapamycin (RP), or PI3K inhibitor LY294002 (LY) or a mixture of mTOR and MAPK inhibitors (PD+RP) or DMSO as a control (Untr) and refed with serum in the presence of 5-FUrd and the respective inhibitors. 30 min after serum addition cells were fixed and analyzed by indirect immunofluorescence using antibodies specific to human KDM4A (panels 1) and 5-FUrd (panels 2); nuclear DNA was stained by DAPI (panels 3). Bar = 5  $\mu$ M.

**B.** U2OS cells were serum starved for 24 hours. Starved cells were incubated for 30 min with PI3K inhibitor PI-103, AKT inhibitor AKTVIII (AKT-i), or DMSO (Untr) and refed with serum in the presence of 5-FUrd and the respective inhibitors. 30 min after serum addition cells were fixed and analyzed by indirect immunofluorescence using antibodies specific to human KDM4A (panels 1) and 5-FUrd (panels 2); nuclear DNA was stained by DAPI (panels 3).

**C.** Quantification of 5-FUrd staining from Fig. 4A experiment (left) or Fig 5B experiment (right) done as in **Fig. 2F**. The effect of inhibitors or combination of inhibitors are all significant ( $p$  value  $< 10^{-4}$ , Wilcoxon test), except treatment with PD alone. Note that no incorporation could be measured upon AKT inhibition.

**D.** U2OS cells were transfected with an expression vector encoding myc-tagged PTEN either wild-type (PTEN-WT) or mutated for its lipid phosphatase activity (PTEN-m). 24 hours following transfection, cells were serum starved for 24 hours and refed with serum containing 5FUrd (+serum, panels 4, 5, 6) or left starved and treated with 5FUrd for 30 min (no serum,



panels 1, 2, 3). Cells were fixed and analyzed by indirect immunofluorescence using antibodies specific to c-myc Tag to detect overexpressed PTEN (panels 1 and 4); KDM4A (panels 2 and 5); nuclear DNA was stained by DAPI (panels 3 and 6).

**Figure 5. PI3K/PDK1/SGK1 signalling cascade controls nucleolar localization of KDM4A.**

**A.** U2OS cells were serum starved for 24 hours. Starved cells were incubated for 30 min with PDK1 inhibitor GSK2334470 (PDK1i), or PI3K inhibitor LY294002 (LY) or DMSO as a control (Untr) and refed with serum in the presence of 5-FUrd and the respective inhibitors (+serum) or left starved (no serum). 30 min after serum addition cells were fixed and analyzed by indirect immunofluorescence using antibodies specific to human KDM4A (panels 1) and Pol-I (panels 2); nuclear DNA was stained by DAPI (panels 3). Bar = 5  $\mu$ M.

**B.** U2OS cells were serum starved for 24 hours. Starved cells were incubated for 30 min with SGK1 inhibitor GSK650394 (SGK1i), or DMSO as a control (Untr) and refed with serum in the presence of 5-FUrd and inhibitor (+serum) or left starved (no serum). 30 min after serum addition cells were fixed and analyzed by indirect immunofluorescence using antibodies specific to human KDM4A (panels 1) and Pol-I (panels 2); nuclear DNA was stained by DAPI (panels 3). Bar = 5  $\mu$ M.

**C.** U2OS cells were electroporated with either a non-targeting siRNA (siScr) or two siRNAs directed against SGK1 (siSGK1.1 and siSGK1.2) and kept in serum free medium for further 24 hours before serum refeeding in the presence of 5-FUrd. 30 min after serum addition, cells were fixed and analyzed by indirect immunofluorescence using antibodies specific to human KDM4A (panels 1) and Pol-I (panels 2); nuclear DNA was stained by DAPI (panels 3). Bar = 5  $\mu$ M.

**Figure 6. Refeeding of starved cells led to KDM4A dependent demethylation of specific histone targets at the transcriptionally permissive rDNA repeats.**

**A.** Specific KDM4A activity is required for serum driven activation of rRNA synthesis. U2OS cells were electroporated with an expression vector encoding either wild type KDM4A (WT) or catalytically inactive mutant (MUT) or with empty vector (vector) together with a siRNA targeting the 5'UTR of KDM4A, in order to knock-down endogenous KDM4A while allowing expression of exogenous KDM4A proteins. Cells were grown for 24 hours and then starved for another 24 hours before serum refeeding in the presence of 5-FUrd. 30 min after serum addition cells were fixed and analyzed by indirect immunofluorescence using antibodies specific to HA-tag, (panels 1), 5-FUrd (panels 2); nuclear DNA was stained by DAPI (panels 3). Merged images are shown (panels 4). Bar = 5  $\mu$ M.

**B.** Quantification of 5-FUrd staining of A done as in **Fig. 2F**. Note that the 5FUrd levels of the cell populations overexpressing the MUT and the WT are significantly different ( $p$  value =  $4,97 \times 10^{-9}$ , Wilcoxon test).

**C.** Chromatin was isolated from starved and starved-refed cells (30 min after serum addition) and subjected for the first round of immunoprecipitation using antibody specific to Pol-I subunit A135. After elution chromatin was subjected to the second IP round using antibody specific to KDM4A and analyzed by qPCR as in **Fig 1C**. The value of each bar represents the difference between the signals from the specific antibody and from the negative control (an appropriate IgG) expressed as % from total chromatin input (see **Fig. S3D** for raw data). Standard deviations from three independent experiments are shown.

**D, E.** Chromatin was isolated from starved (D) and starved-refed U2OS cells (1 hour after serum addition) (E) and the same quantities of a chromatin were subjected for the first round of immunoprecipitation using antibody specific to Pol-I subunit A135. After elution, the chromatin was subjected for the second IP round using antibodies specific to histone H3, H3K9me1, H3K9me2 and H3K9me3 and analyzed by qPCR as in **Fig 1C**. The value of each

bar represents the difference between the signals from the specific antibody and from the negative control (an appropriate IgG) expressed as % from total chromatin input normalized to H3 signal (see Fig. S3E for raw data). Standard deviations from three independent experiments are shown.

**F, G.** U2OS cells were transfected with KDM4A specific siRNA3. 24 h post-transfection cells were starved for 24 hours. Chromatin was isolated from starved (F) and starved-refed cells (1 hour after serum addition) (G). Chromatin was analyzed as in D and E (see Fig. S3F for raw data).

**Figure 7. KDM4A is not essential for support of ongoing Pol-I transcription and cell growth.**

**A.** Schematic representation of the labelling of cells with  $^3\text{H}$ -uridine to determine the effect of KDM4A depletion on ongoing rRNA synthesis.

**B.** The relative efficiencies of rRNA synthesis were quantitated and transcript levels are indicated for 47S/45S pre-rRNA. The data, expressed as a percentage of the highest value (set at 100 %), the standard deviations for three independent experiments are shown.

**C.** The relative efficiencies of cell growth were determined using MTT assay. The standard deviations for four independent samples are shown.

**D.** Growing U2OS cells (~70% confluent) were electroporated with an expression vector encoding either wild type KDM4A (WT) or catalytically inactive mutant (MUT). Cells were grown for 48 hours and then 5-FUrd was added for 30 min and cells were fixed and analyzed by indirect immunofluorescence using antibodies specific to 5-FUrd (anti-BrdU antibodies); nuclear DNA was stained by DAPI.

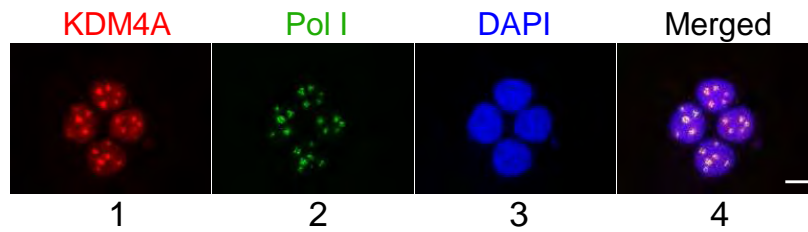
**E.** Box-plot of the quantification as in Fig. 2F of 5-FUrd staining of D obtained using image J.

**Figure 8.** Schematic outline of signaling pathways controlling rDNA transcription in response to growth factors/nutrients. PI3K- Akt, mTOR and MAPK pathways regulate rRNA gene transcription by targeting RNA polymerase I machinery. PIK3-PDK1-SGK1 signalling cascade regulate activation of rRNA gene transcription by controlling rDNA chromatin level through KDM4A localization.

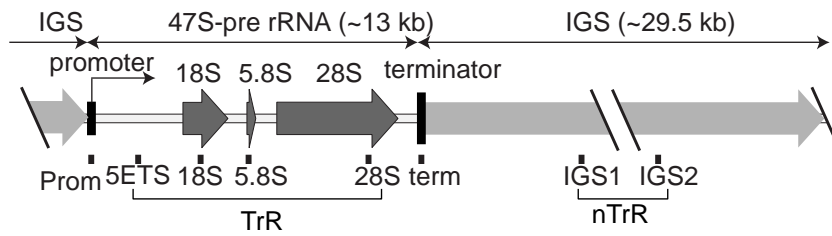
|



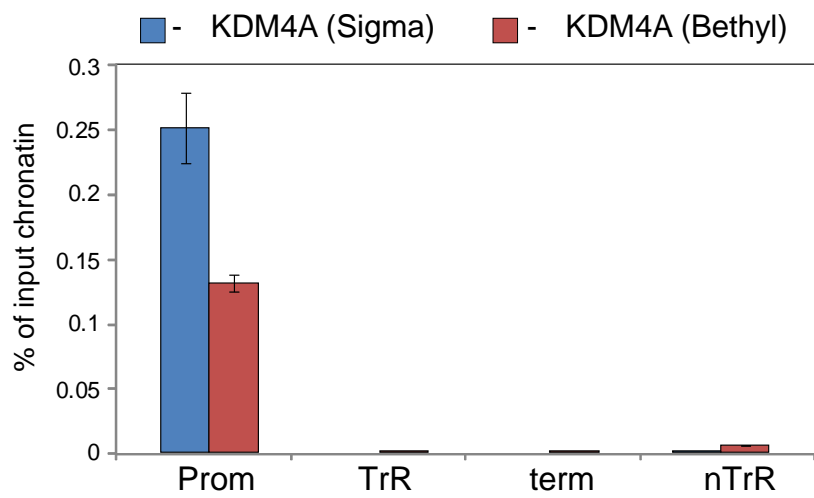
A



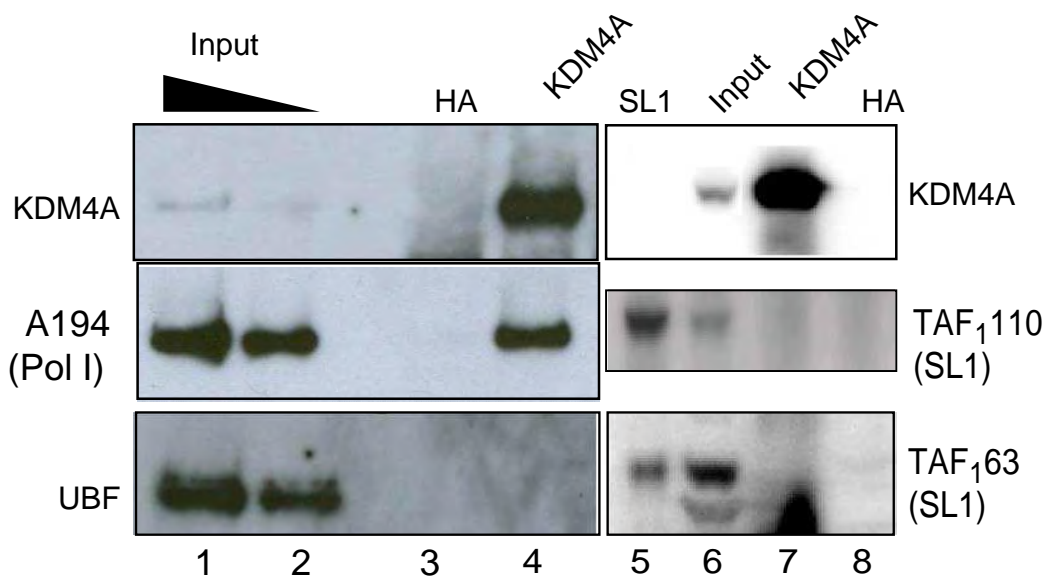
B

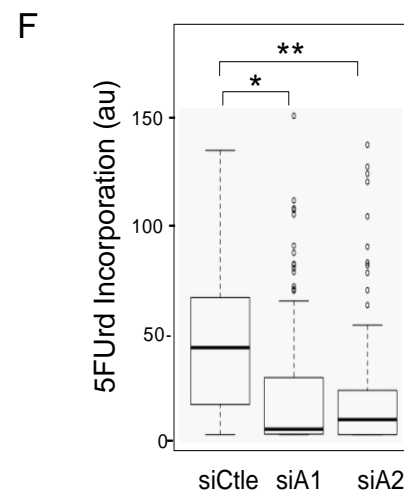
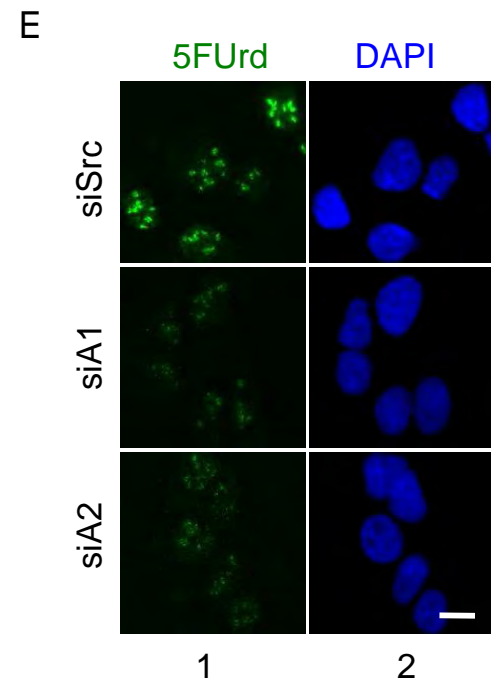
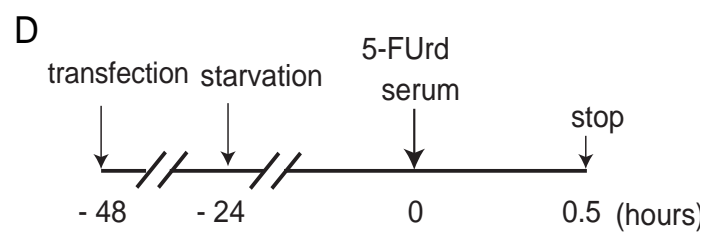
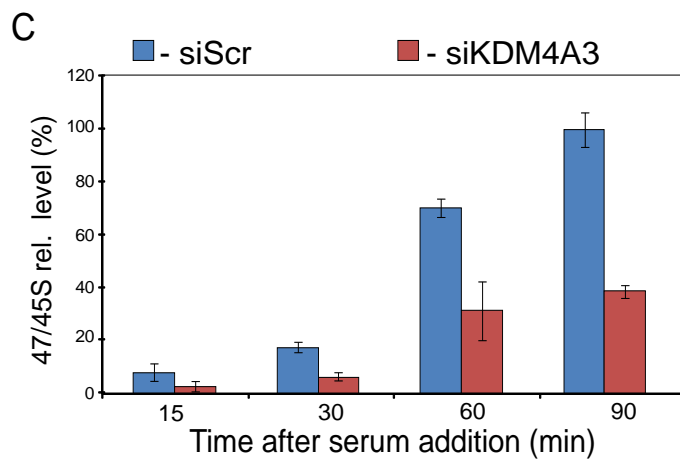
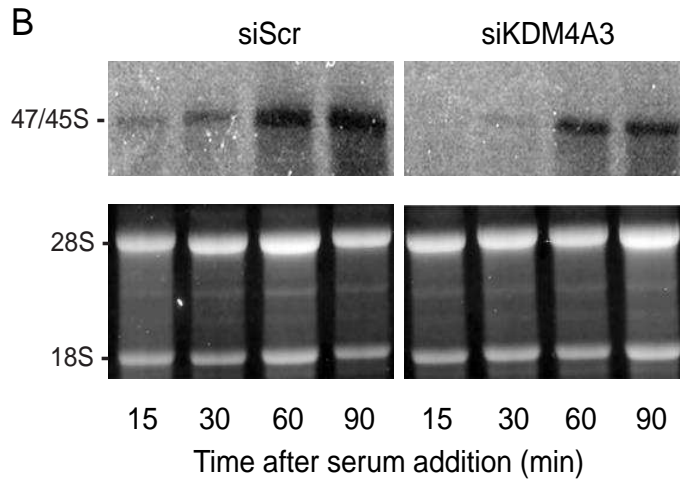
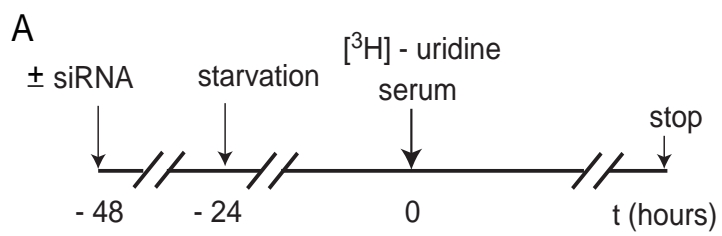


C

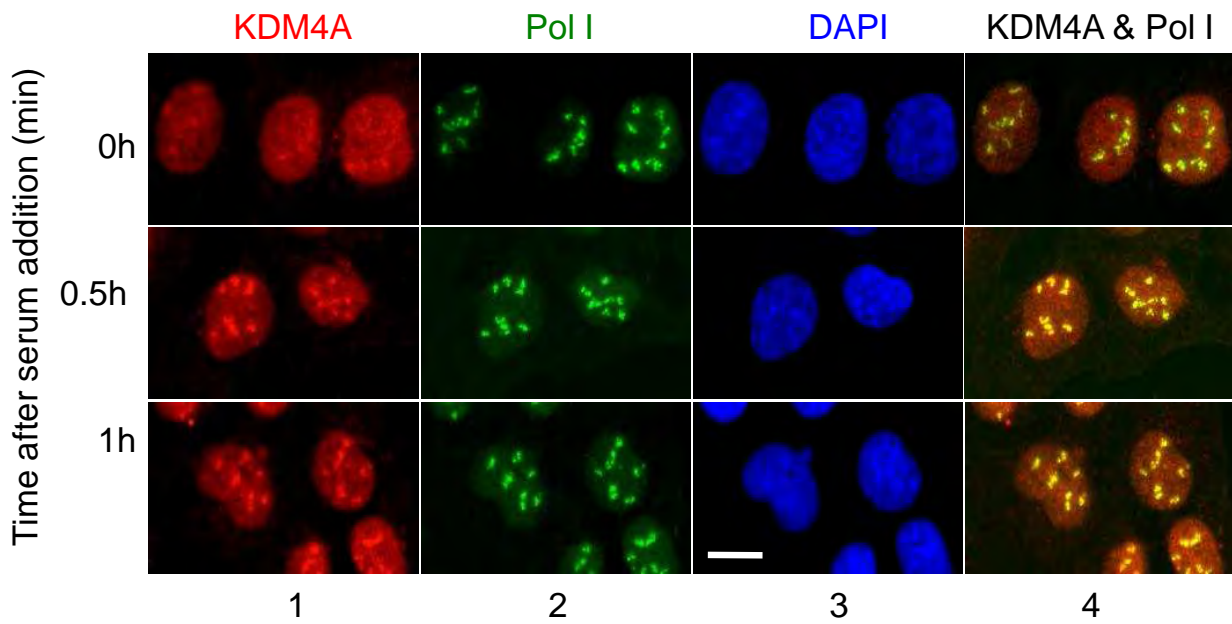


D

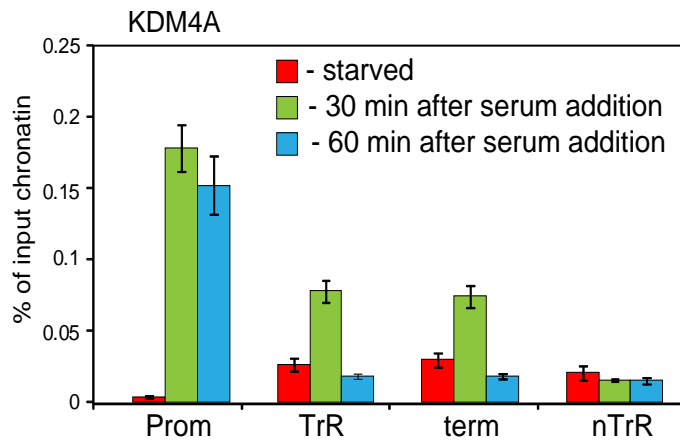




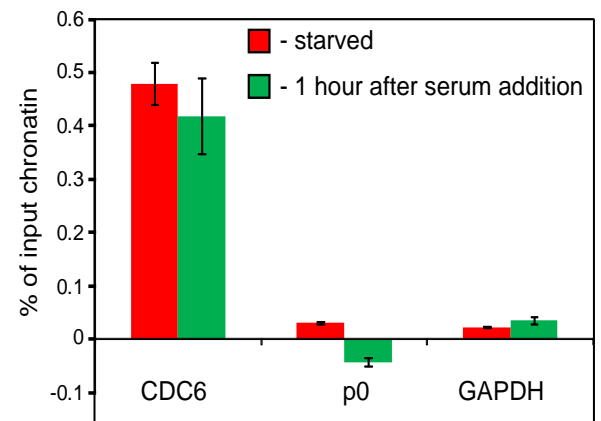
A



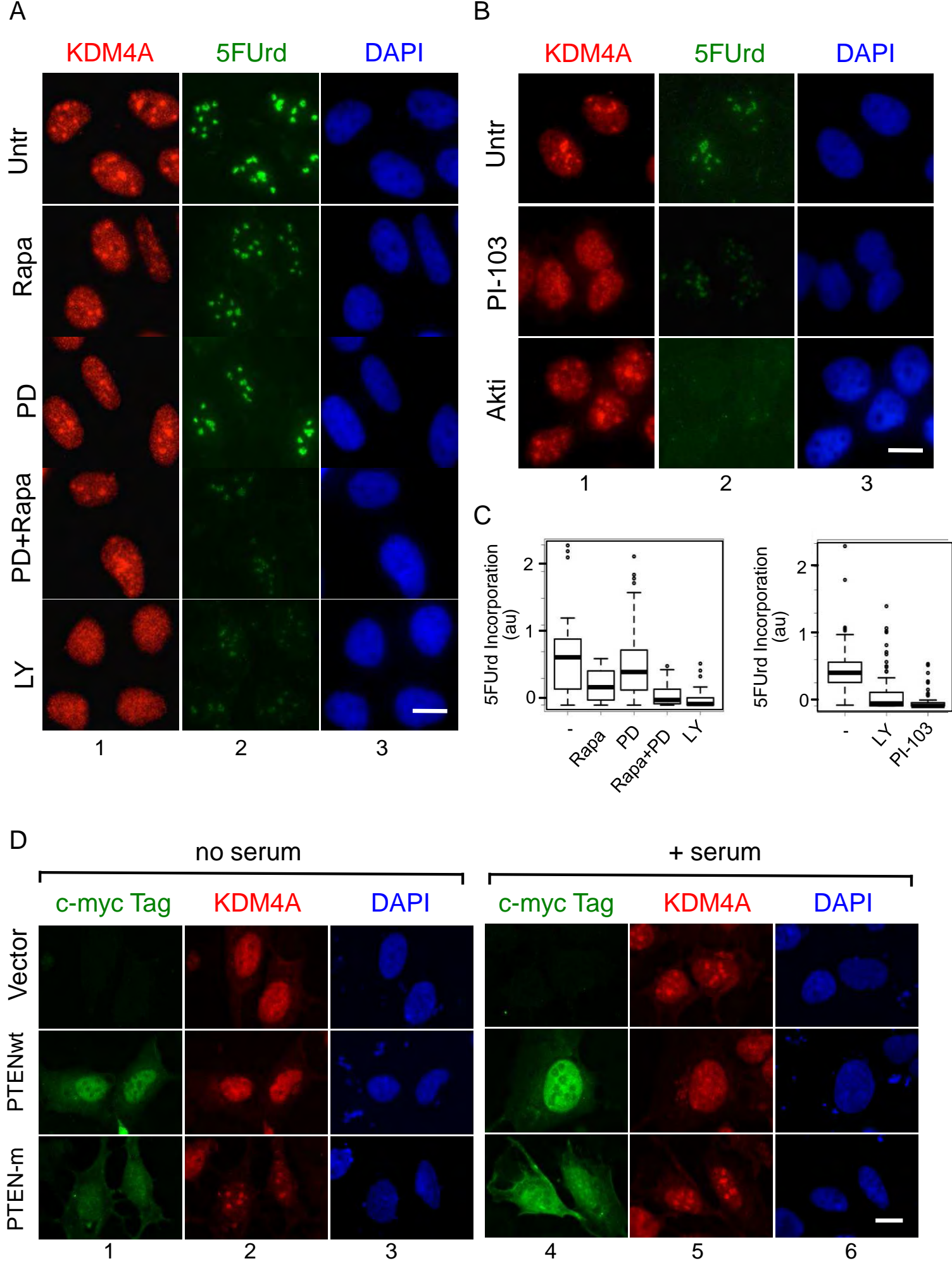
B

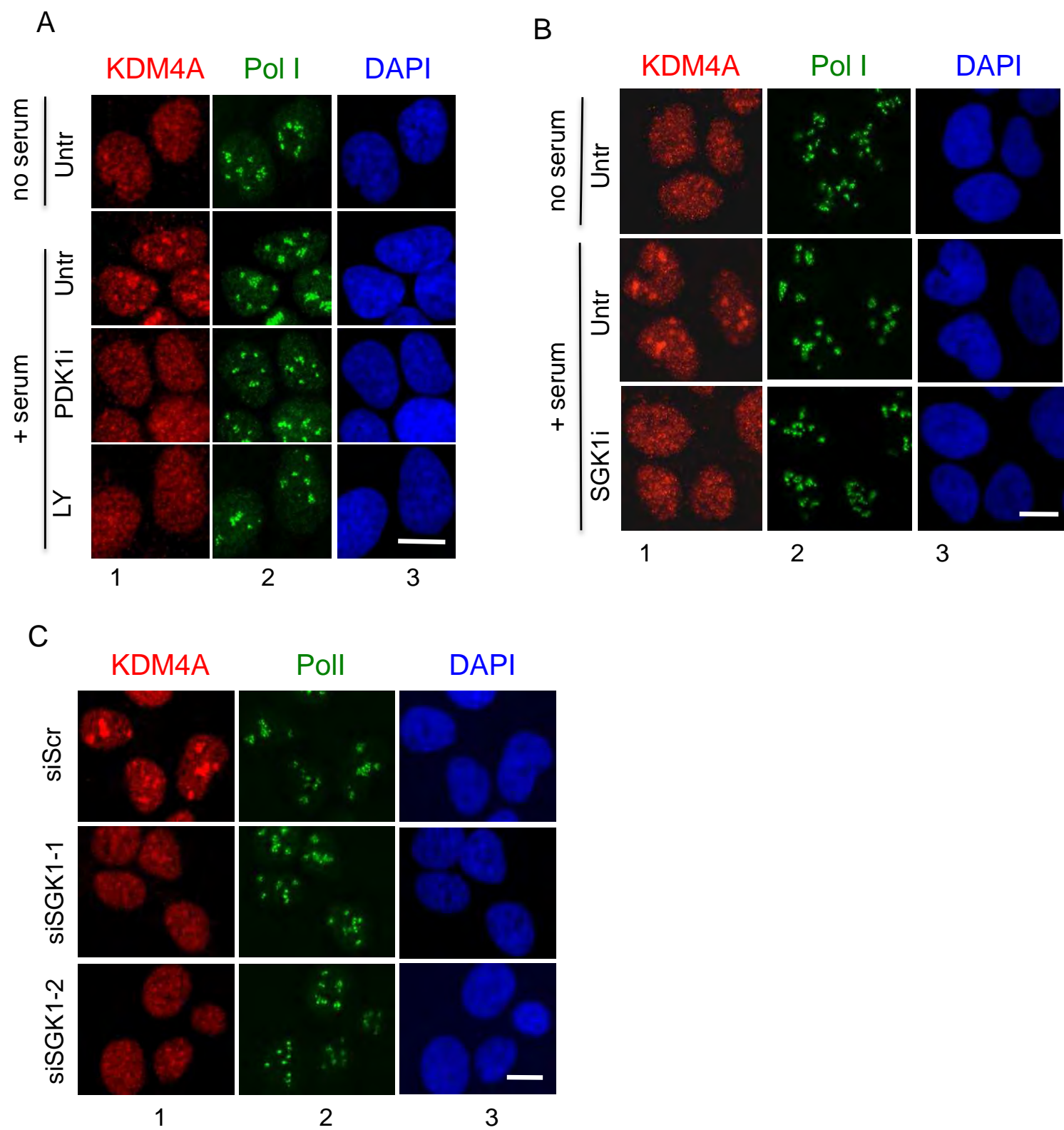


C

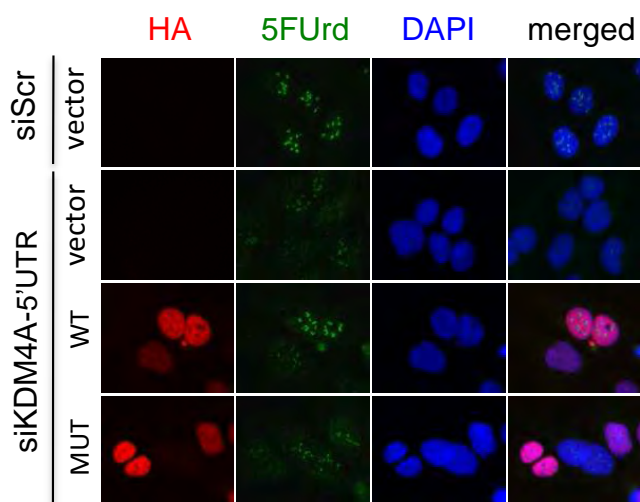




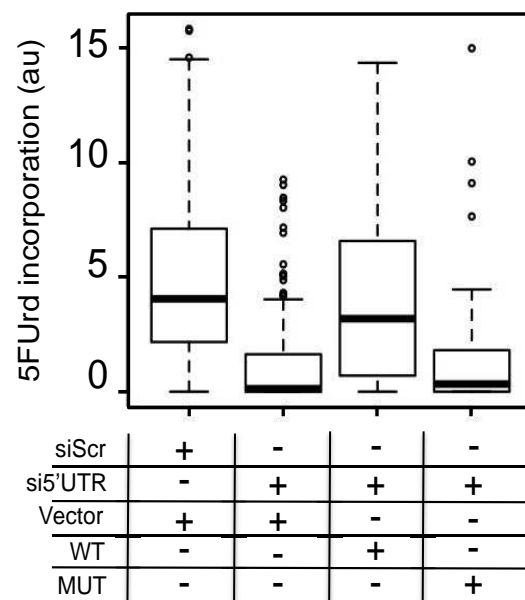




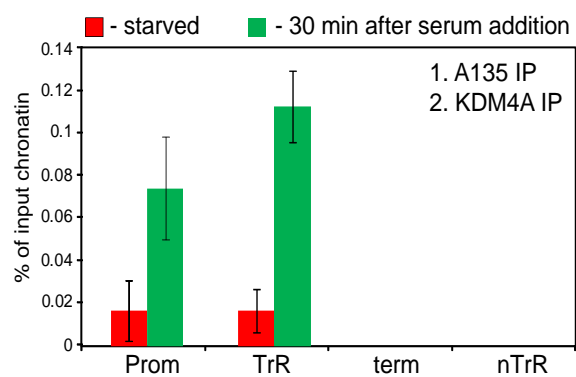
A



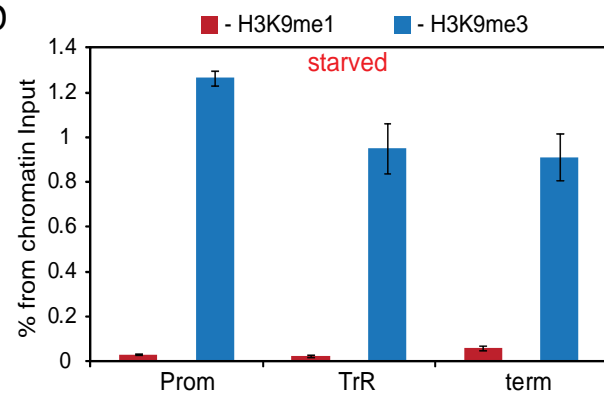
B



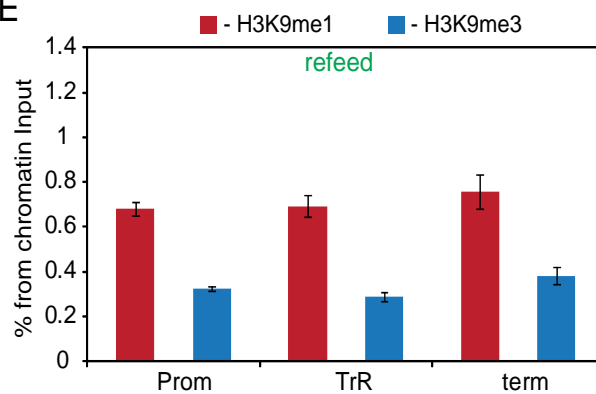
C



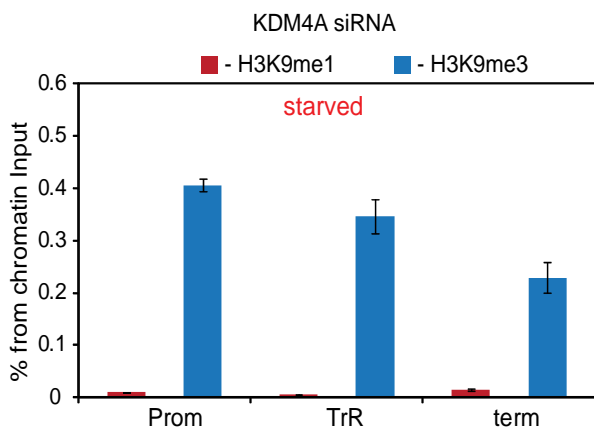
D



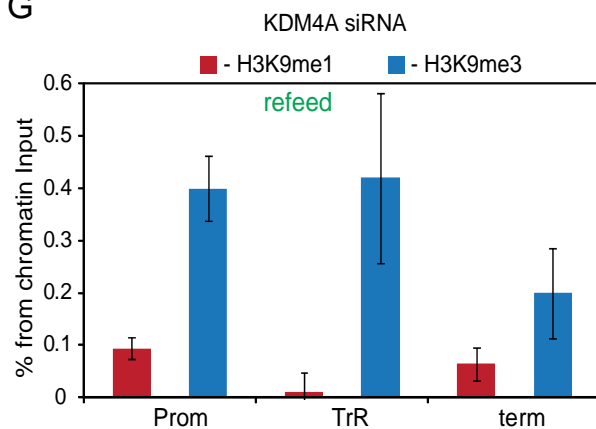
E

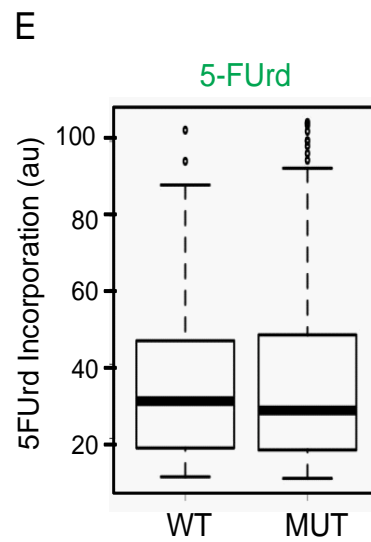
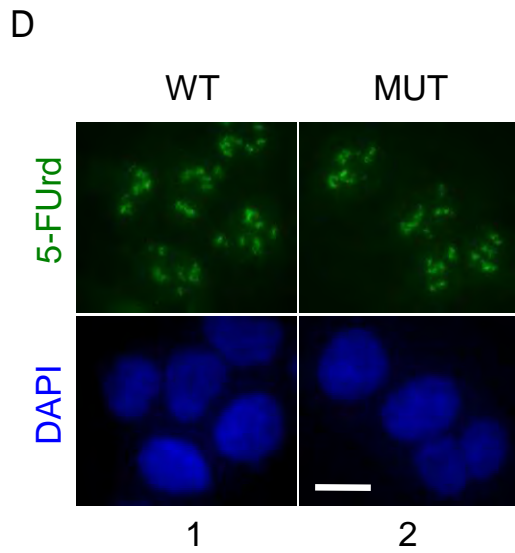
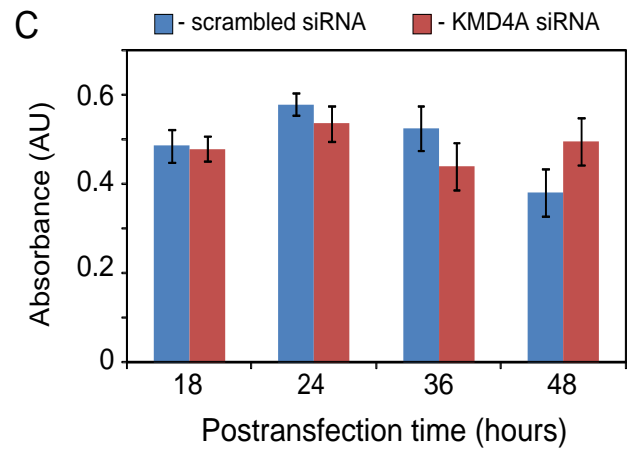
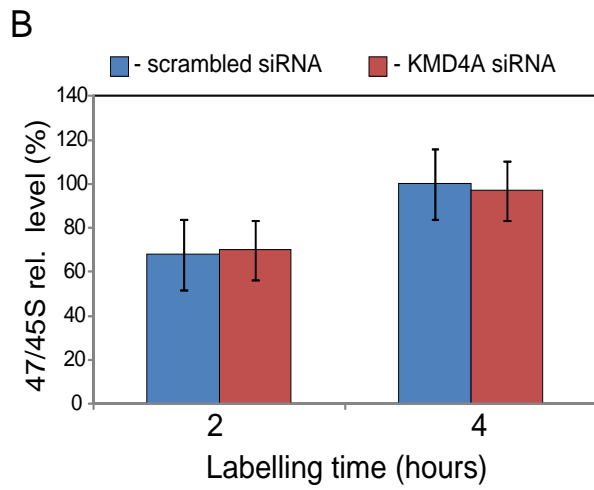
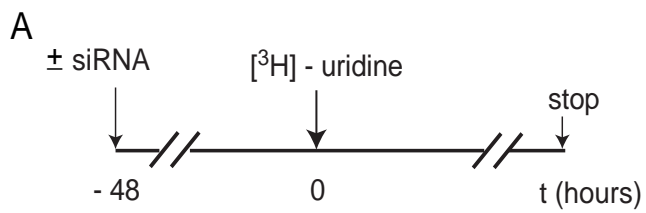


F



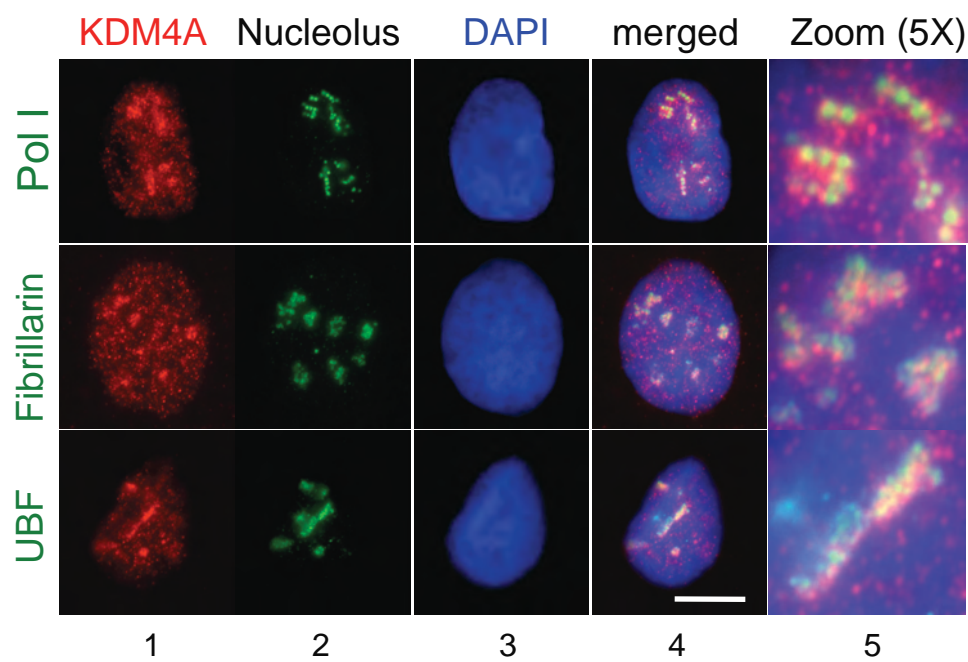
G



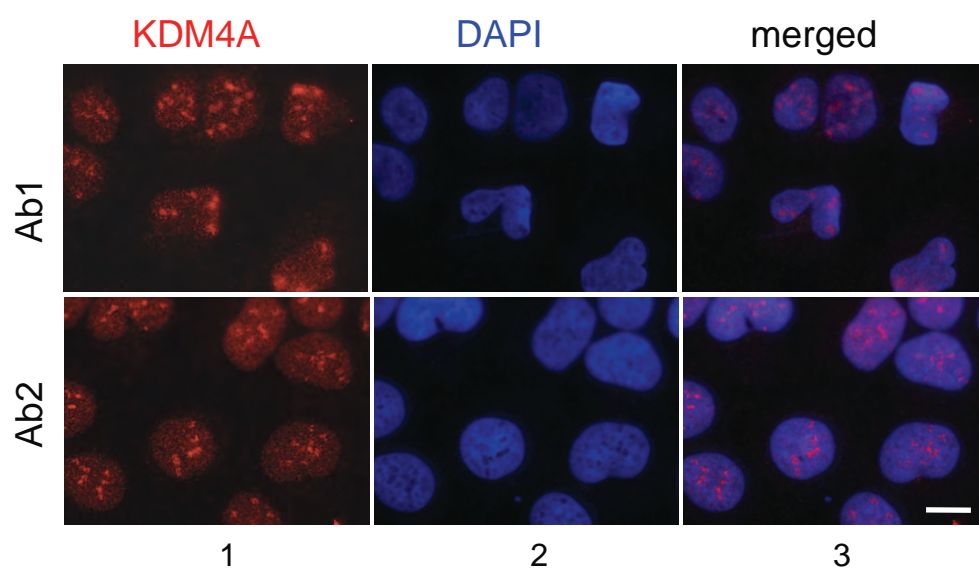


Salifou et al., Figure 7

A

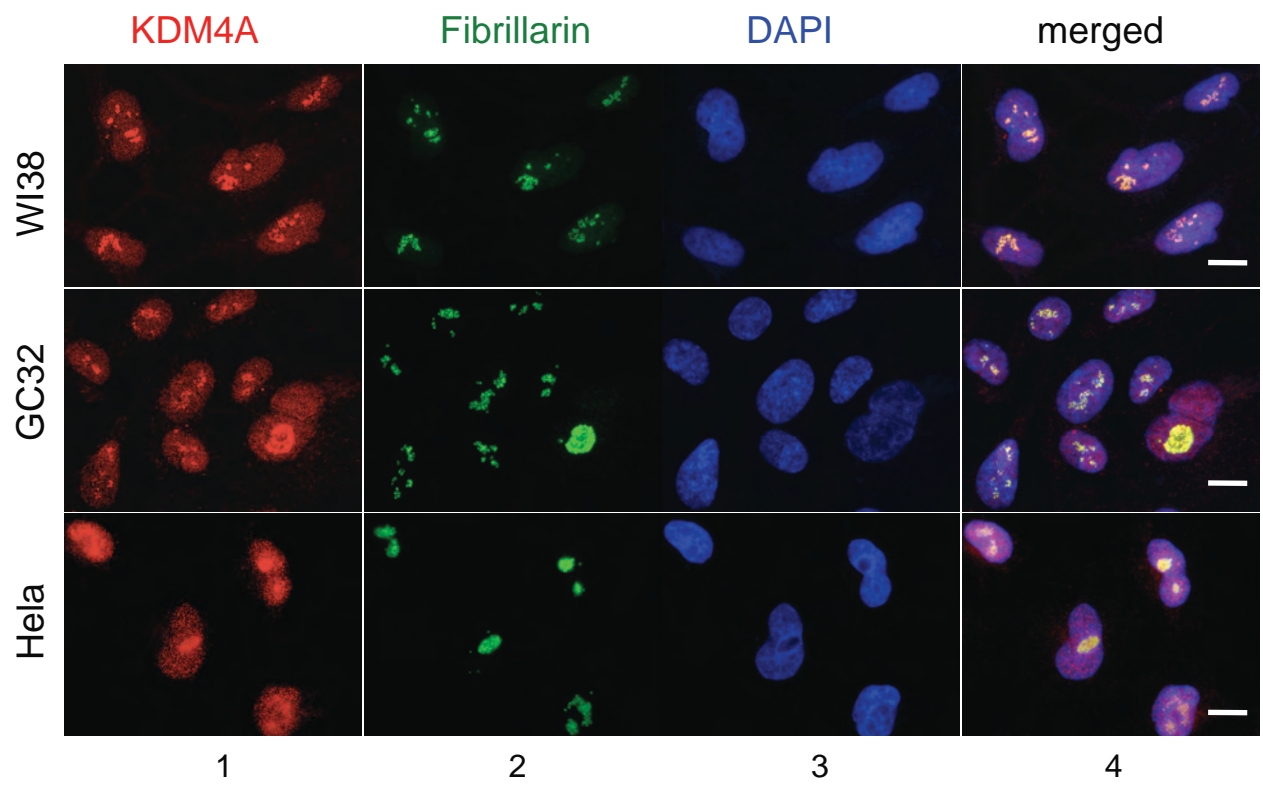


B

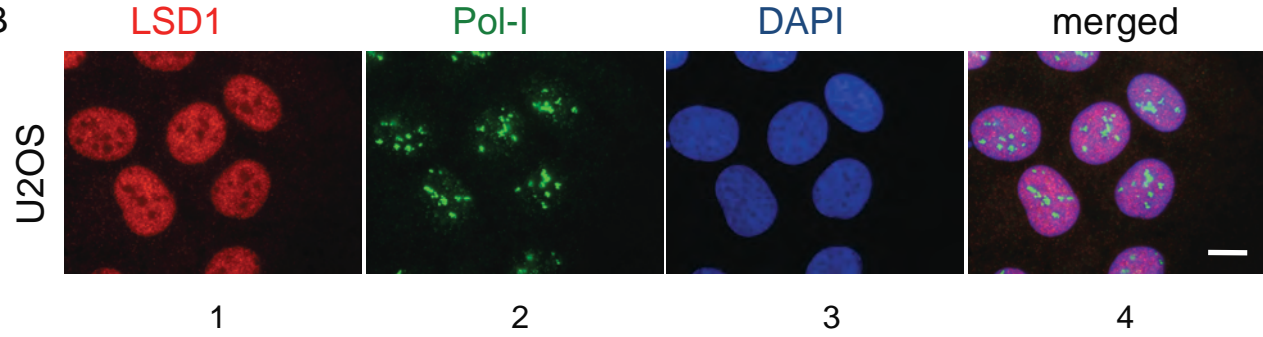


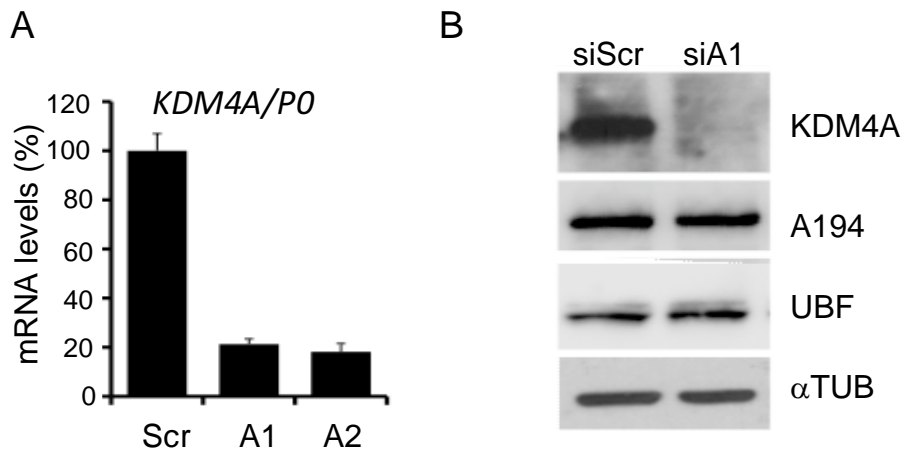


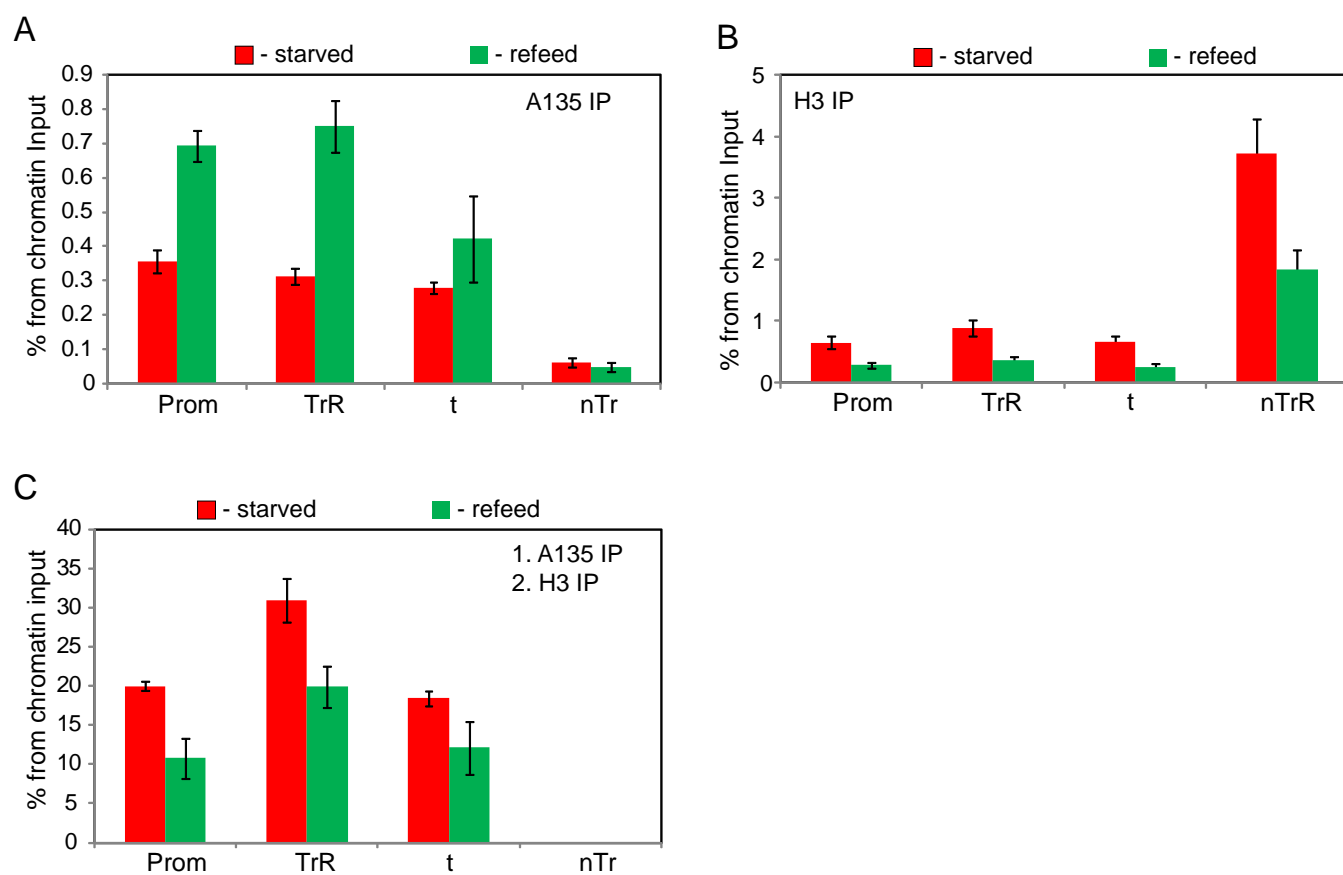
A



B

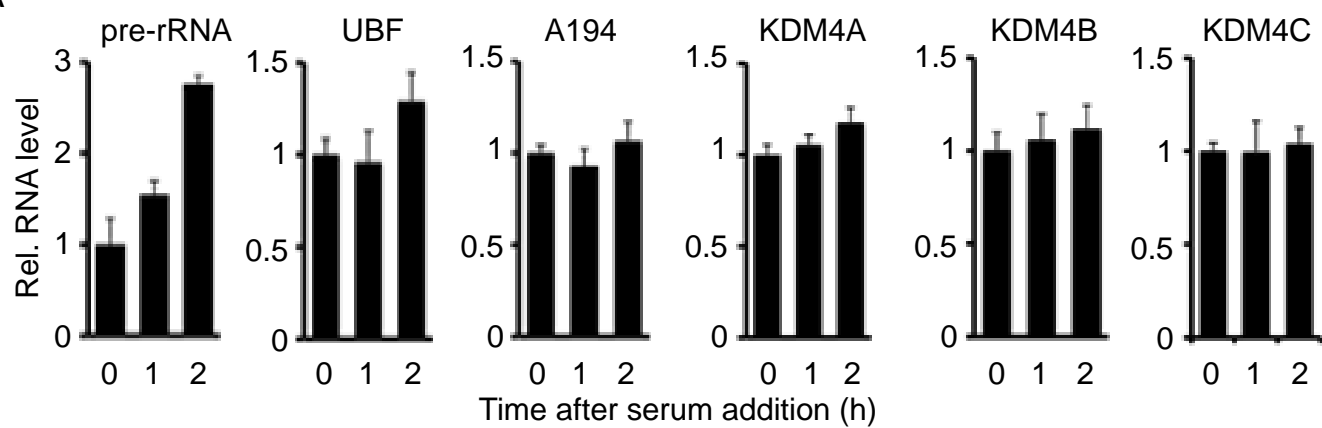




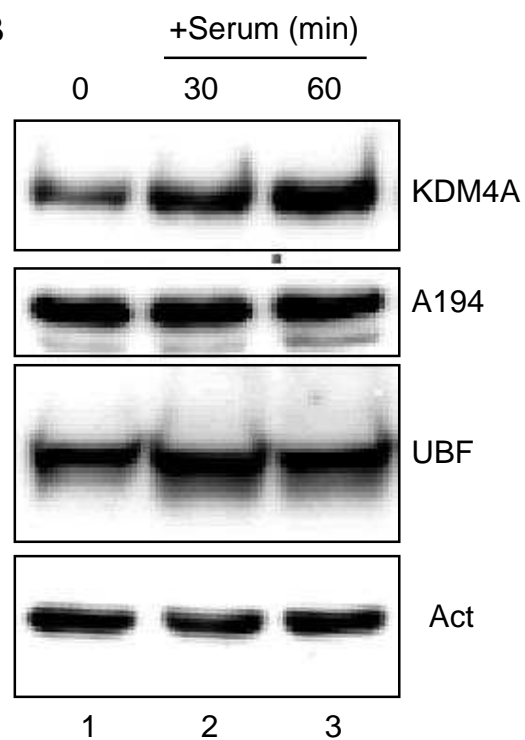




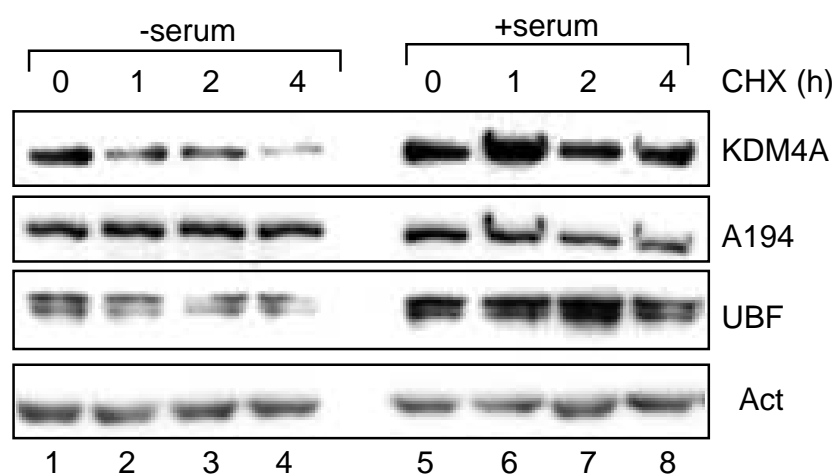
A

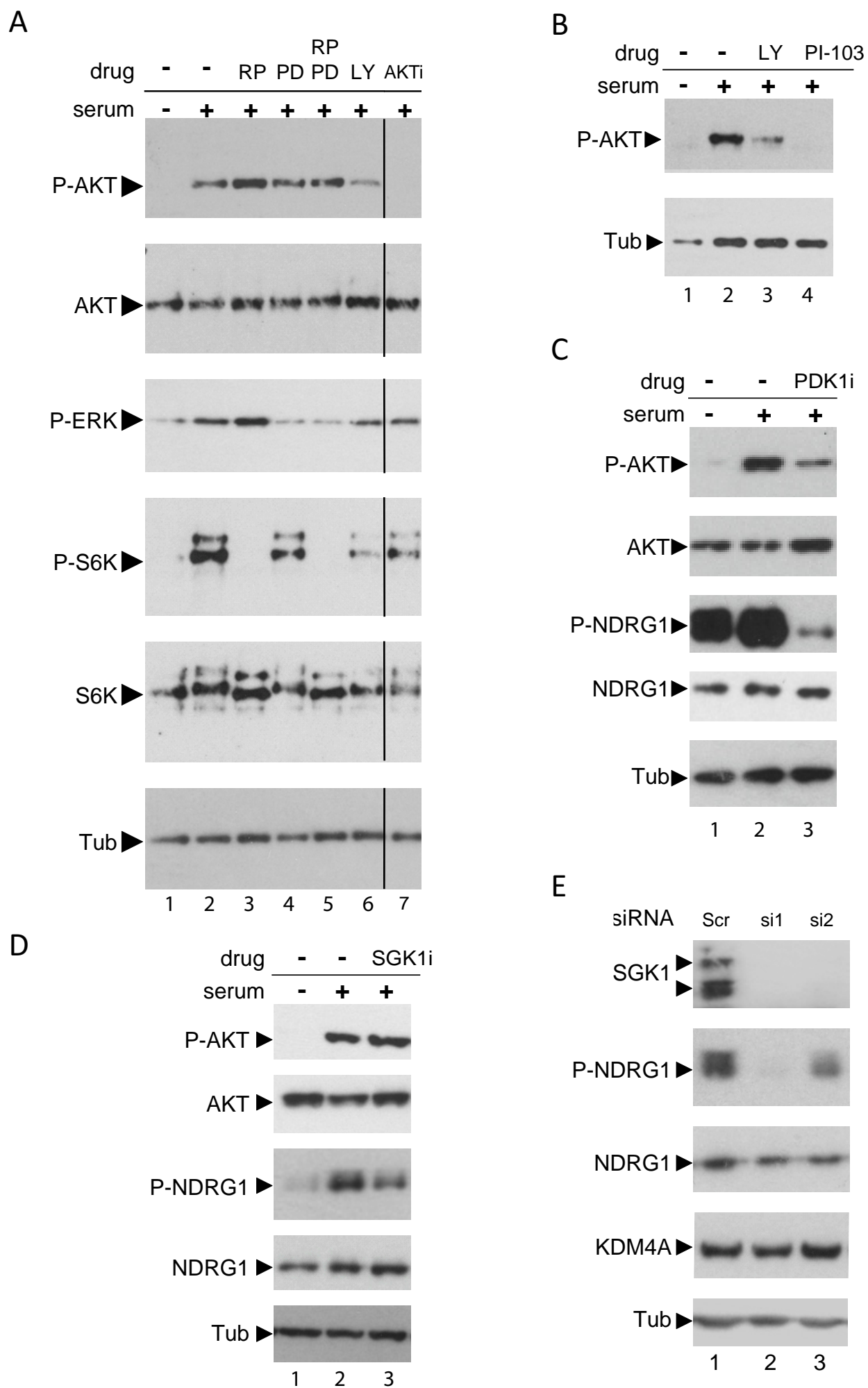


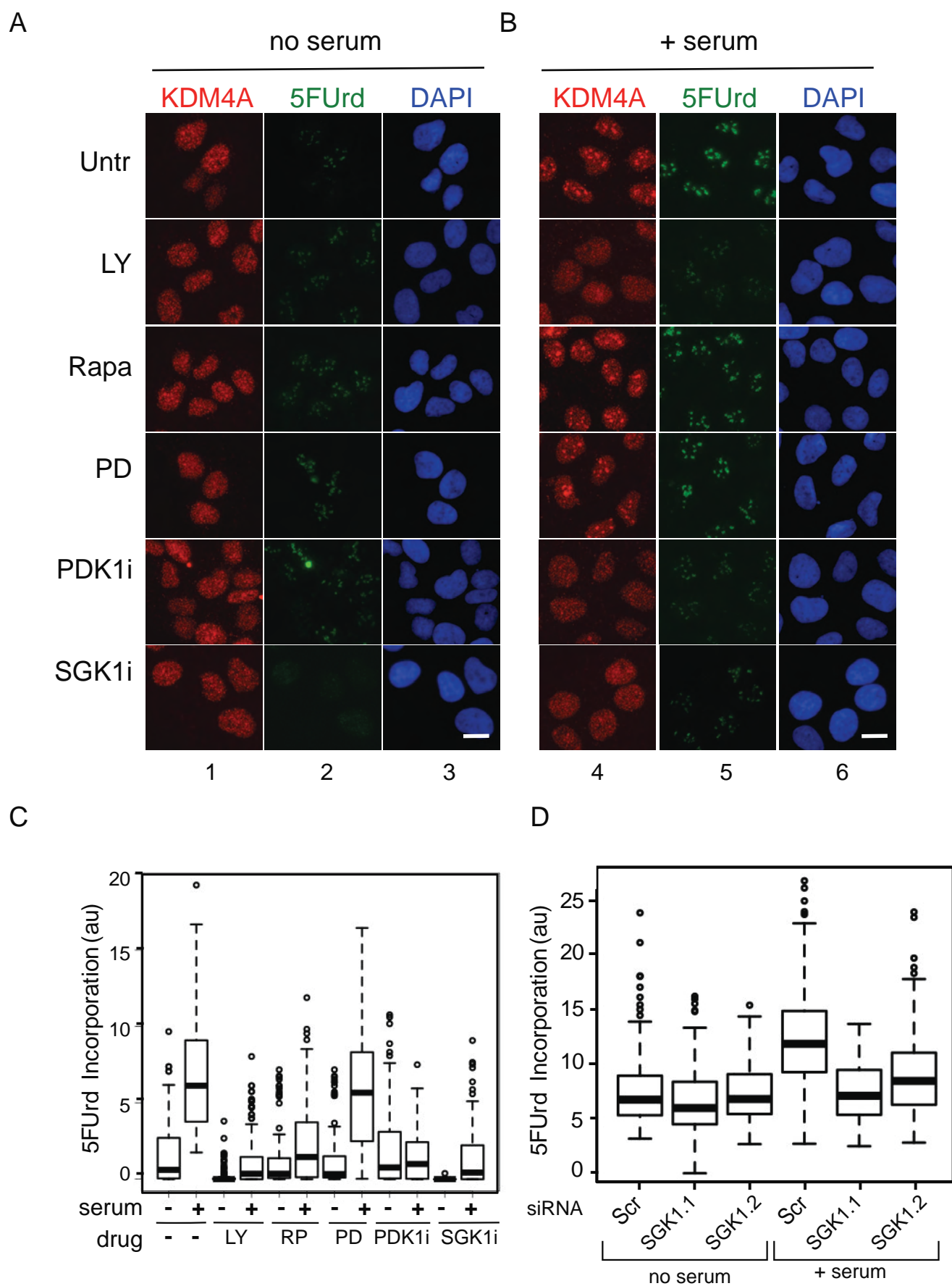
B



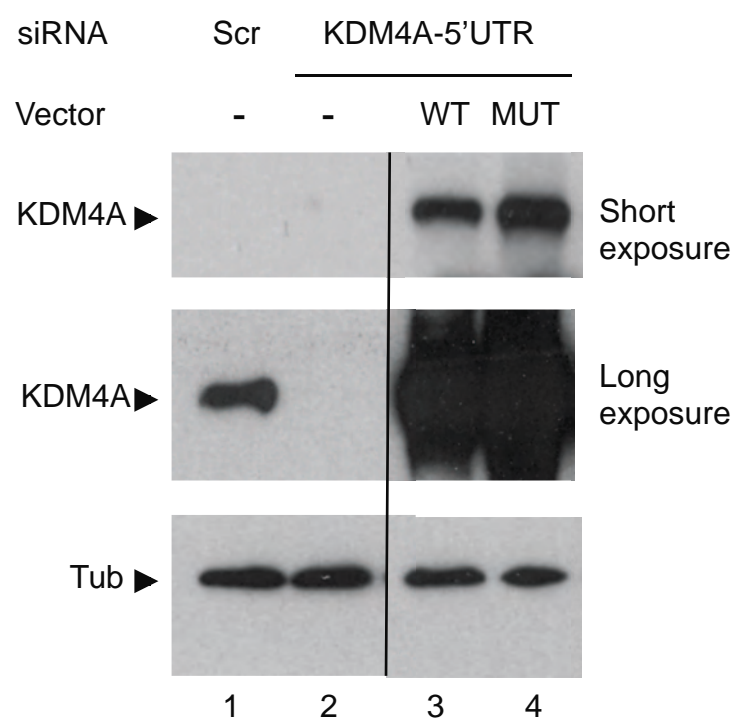
C



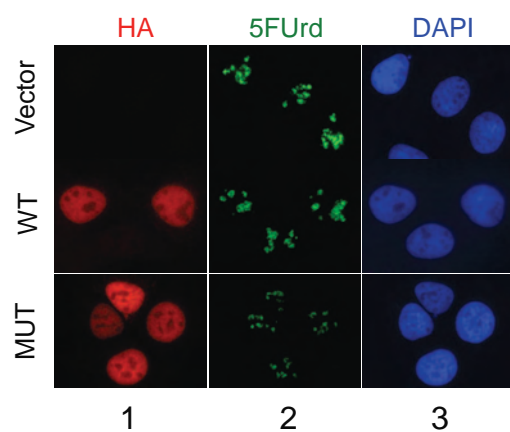




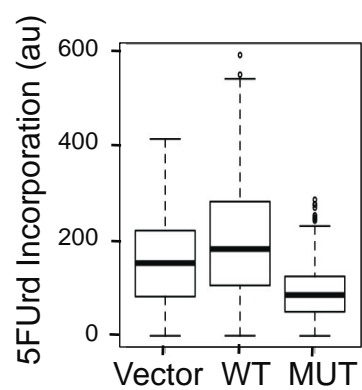
A



B



C



## Online Methods

### *Cell-culture conditions*

U2OS cells were obtained from ATCC and maintained according to the supplier's instructions in McCoy's 5A medium plus 10% FBS (PAA). For serum starvation-refeeding experiments cell were grown to ~60–70% confluency, washed twice with Dulbecco's PBS and then serum-starved for 20–24 h in DMEM low glucose (1 g/l). For activation of Pol-I transcription, serum-starved cells were incubated in DMEM low glucose (1 g/l) containing 20% FBS (Lonza). All media were supplemented with 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Gibco) and cells were maintained in a 37<sup>o</sup> C incubator with 5 % CO<sub>2</sub>.

The final concentration of kinase inhibitors dissolved in DMSO was as described elsewhere: PD98059 (25 µM); Rapamycin (50 nM); LY29002 (20 µM), PI-103 (5 µM); AktVIII (2.5 or 5 µM), GSK2334470 (1µM), GSK650394 (10 µM). They were added to cells 1 hour before refeeding and kept afterwards. Cycloheximide (Sigma) was used at 100 µM as previously described for the study of KDM4A stability in U2OS cells.

### *Plasmids, siRNA and transfection*

Wild-type human HA tagged KDM4A CMV-driven expression plasmid was a gift from J. Christensen. The demethylase-dead KDM4A mutant was constructed by mutating H188 to A, directly in the WT plasmid using the quick change mutagenesis kit following the manufacturer's instructions (Agilent Technologies). siRNA were purchased from eurogentec and are described in Table S3. For transfection, 10<sup>6</sup> U2OS cells were electroporated with double-stranded siRNA to a final concentration of 1 µM, separately or together with 2 µg of plasmids by using an eletroporation device (Amaza AG, Cologne, Germany) according to the manufacturer's specifications (Buffer V, X001 program). Expression plasmids encoding myc tagged wild-type PTEN (pcDNA3-PTENwt) and mutant PTEN deficient in lipid phosphatase activity, pcDNA3- PTEN (G129E: PTENmut) were a gift from Evelyne Goillot (ENS Lyon, France). Cells were seeded on glass coverslips and transfected with either empty pcDNA3, pcDNA3-PTENwt or pcDNA3-PTENmut using jetPEI with a ratio of 1 µg DNA for 2 µl of jetPEI following the manufacturer's recommendation (Ozyme).

### *RNA labeling in cells and rRNA analysis*

Labeling of RNA in cells (~70% confluent or ~50% for starved/refed) and RNA analysis was performed essentially as described<sup>48</sup> using 10 mCi <sup>3</sup>H-uridine for ~0.2– 0.4 x 10<sup>5</sup> cells per well of a six-well plate. RNA was extracted (Pure Link RNA Mini kit, Life Technologies). 2 µg of <sup>3</sup>H-labelled total RNA was run on a 1% formaldehyde agarose gel at 120V for 95 min in 1X MOPS, blotted onto Hybond-N membrane (Amersham), cross-linked (ultraviolet cross-linker; UVP), analysed by tritium imaging using Fuji Tritium image plate (or following PerkinElmer En<sup>3</sup>Hance spray, exposed to Kodak Biomax XAR film at -80<sup>0</sup> C) and then quantified using Aida software. The standard deviation was calculated from three independent experiments.

*In situ* RNA labeling was performed using 5-Fluorouridine (5-FUrd, Sigma). Cells were incubated with 1mM 5F-Urd for 30 min prior to fixation with 4% paraformaldehyde in PBS, for 15 min at 4°C. 5-FUrd incorporation was analyzed by immunofluorescence using anti-BrdU antibodies (BU-33, Sigma). All the staining procedure was performed at 4°C, in the presence of 0.4 U/ml RiboGuard RNase inhibitor (Epicentre). Quantification of fluorescence levels was done on ~100–200 cells per slide using home-developed macros in ImageJ software (National Institutes of Health) and analyzed using the R open source software R Core Team (2014), (<http://www.R-project.org/>).

#### *Chromatin immunoprecipitation (ChIP) and sequential chromatin immunoprecipitation (sChIP) assay*

Cells were grown until 70% confluent, cross-linked with formaldehyde (final concentration 1%) for 10 min and the cross-linking was stopped by addition of glycine (final concentration 0.125 M) for 5 min. Crosslinked chromatin was sheared using Biorupter (Diagenode) to 300-base-pair average size. For single round ChIP, immunoprecipitation was carried out using chromatin isolated from 1x10<sup>6</sup> cells, antibodies listed in Table S1 or appropriate control IgGs and 30 µl of Protein A/Protein G magnetic beads (Life Technologies). For sChIP, first round of immunoprecipitation was carried out using chromatin isolated from ~7x10<sup>6</sup> cells, 200 µg RPA135 antibody (Supplemental Table S1) and 200 µl of Protein A/Protein G magnetic beads (Life Technologies). Chromatin was eluted from beads using two steps elution. Initially beads were incubated overnight at 4<sup>0</sup>C in 400 µl of re-ChIP elution buffer (1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1) containing 80 µg of RPA135 (N-17) P peptide (Santa Cruz). Next, beads were resuspended in 100 µl of

10mM DTT in re-ChIP elution buffer and incubated 30 min at 37<sup>0</sup>C. Eluates from both steps were pooled, and volume was adjusted to 5 ml by ChIP IP buffer (1% Triton X-100, 0.1% Sodium Deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, 125 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5). Second round of immunoprecipitation was carried out using 1 ml of chromatin from the first round (equivalent of ~ 1.4\*10<sup>6</sup> cells), antibodies listed in Table S1 or appropriate control IgGs and 30 µl of Protein A/Protein G magnetic beads (Life Technologies). Purified immunoprecipitated DNA was analysed by two tetraplex qPCR panels designed for 8 regions of the rDNA repeat; Promoter, IGS4, 18S, 5.8S and 28S, Terminator, IGS1 and 5'ETS (see Table S2 for primers and probes sequences). Reactions were carried out on a Lightcycler 480 with a reaction volume of 10 µl per well in triplicates. The specific signals were calculated as the difference between the signals from the specific antibody and from the negative control (an appropriate IgG) and were expressed as percentage of input chromatin. When mentioned the specific signals of modified histone H3 were normalized to the specific H3 signals with the standard deviation calculated from three independent ChIP experiments. Signal representing the transcribed region (TrR) is the average of the combined signal from 5'ETS, 18S, 5.8S and 28S rRNA. Signal representing the non transcribed region (nTrR) is the average of the combined signal from IGS1 and IGS2.

### *Immunofluorescence*

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) and permeabilized with 1% Triton X100 in PBS or permeabilized 5 min at 4° with 1% Triton X100 prior to fixation with 4% PFA as indicated in figure legends. Cells were then incubated at 4°C overnight with the indicated primary antibodies: Rabbit polyclonal anti-JMJD2A (Bethyl A-300-861-A; 0.5 µg/ml), Rabbit polyclonal anti-KDM4A antibodies (Sigma, HPA007610, 0.5 µg/ml), Rabbit polyclonal anti-HA (Cell Signaling C29F4, 1 µg/ml), RPA 194 Santa Cruz SC-48385 1 µg/ml, mouse monoclonal anti-UBF (SC-13125 1µg/ml), mouse monoclonal anti-BrdU 2 µg/ml (BU-33, Sigma), mouse monoclonal anti-myc antibodies (9E10, Santa-Cruz). AlexaFluor-conjugated secondary antibodies were purchased from Fisher Scientific. Observations were carried out with a fluorescence microscope (DM5000; Leica, Wetlar, Germany) equipped with a cooled charge-coupled device camera, and images were acquired using the MetaMorph imaging system (Universal Imaging Corp., West Chester, PA). For Z-stacks

acquisition (**Fig. 1B**), images were collected with a DM6000 Leica microscope equipped with semrock filters, a PiFoc piezofocus device (Physic Instrumente), and a CollSnapHQ2 camera (Roper Scientific), controlled by MetaMorph software (Universal imaging Corp.). 5 Z-sections at 0.2  $\mu\text{m}$  spacing were projected onto a single plan.

Whiskers graphs of quantification of 5FUrd staining were obtained with the R open source software R Core Team (2014), (<http://www.R-project.org/>). They show the median, the 25% and 75% quantiles, as well as outliers (outliers are identified by not being in the range  $[25\%\text{Quantile} - 1.5*\text{InterQuantiles}; 75\%\text{Quantile} + 1.5*\text{InterQuantiles}]$  where  $\text{interQuantiles} = 75\%\text{Quantile} - 25\%\text{Quantile}$ ). These representations have to be accompanied by statistical analysis of the comparison between the two populations. Statistical hypothesis tests were applied to confirm whether the hypothesis (that can be seen on the boxplot) that there is a differences between indicators of the 2 populations (such as mean, median, distribution) can be considered as true with a great confidence or can be due to random effect. Because data distribution was not normal (due to a threshold applied during quantification to remove background staining), we used a Wilcoxon test to reject the hypothesis that the two populations means are the same and thus conclude that there is a significant difference between the two means with a confidence a 95%.

#### *Immunoblotting and immunoprecipitation*

For western-blotting, cells were lysed in NuPage Sample lysis Buffer supplemented with reducing agent (Invitrogen) and heated for 5 min at 85°C to denature proteins. Western blots were performed using standard procedures and antibodies were used at the following concentrations: rabbit anti-KDM4A 0.4  $\mu\text{g/ml}$  (Bethyl A-300-861-A), rabbit anti-RPA194 0.2 $\mu\text{g/ml}$  (Santa Cruz SC-48385), mouse anti-UBF 0.2  $\mu\text{g/ml}$  (Santa-Cruz SC-13125), mouse anti- $\alpha$ -tubulin 0.1  $\mu\text{g/ml}$  (T6199, Sigma), rabbit anti p70S6K (Cell Signaling, #9202), rabbit anti-PhosphoS6K (Cell Signaling, #9205), anti-Akt (Cell Signaling, #9272), anti-Phospho-Akt (Ser473) (Cell Signaling, #9271), anti-Phospho-Erk1/2 (Cell Signaling, #9101), anti-NDRG1 (Cell Signaling, #9485); .anti-Phospho-NDRG1 (Cell Signaling, #5482), anti-SGK1 (Cell Signaling, #12103). All Cell signaling Ab were diluted 1/1000. Peroxidase-conjugated secondary antibodies were purchased from Amersham.



For immunoprecipitation,  $10^7$  cells were resuspended in hypotonic buffer (10mM Tris PH 7.4, 1mM  $MgCl_2$ , 10mM KCl, 1mM DTT). After breaking the cells with a Dounce B pestle, nuclei were spin down at 500 g for 10 min and lysed in IP buffer (10 mM Tris pH 8, 0.4% NP40, 300 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM DTT, anti-protease (Roche), anti-phosphatase (Sigma) inhibitors). Lysates were diluted using one volume of dilution buffer (10 mM Tris pH 8, 5 mM  $CaCl_2$ , 2 U/ml RQ1 DNase (Promega) and then incubated with rabbit anti-KDM4A antibodies 1  $\mu$ g/ml (A-300-861-A, Bethyl) or rabbit anti-HA antibodies 1 $\mu$ g/ml (C29F4 Cell signaling) as a control, overnight at 4°C. Protein complexes were pull-down using a mix 1:1 of Protein A coupled to agarose (Sigma): Protein G coupled to Sepharose (Sigma). Following several washes with IP buffer, beads were eluted with NuPAGE sample lysis buffer (Invitrogen) and analyzed by Western blot. All steps were performed at 4°C.

#### *mRNA level analysis*

Total RNA was extracted from cells by using the RNeasy mini kit (Qiagen). Five hundred nanograms of RNA were reverse-transcribed for 50 min at 42°C in a 20  $\mu$ L reaction volume containing 0.5  $\mu$ M dNTPs, 0.5  $\mu$ g of random primers, 10 mM DTT, 1X AMV RT buffer, 40 U of RNasin and 10 U of AMV Reverse Transcriptase (Promega). Samples were incubated for 15 min at 70°C to stop the reaction. Samples were analyzed by qPCR by using the primers described in Table S4 on a CFX96 real-time system device (Biorad) using the platinum SYBR Green qPCR SuperMix (Invitrogen).

### Supplementary Information

The histone demethylase JMJD2A/KDM4A links nutrients/growth factors availability and ribosomal RNA transcription.

Table S1. List of antibodies used in ChIP assay

Cells per IP	Antigen	Source	Cat. number	Amount per IP
1x10 <sup>6</sup>	hA135 (N-17)	Santa-Cruz	Sc-17913	5 µg
	KDM4A/JMJD2A	Bethyl	A300-861A	5 µg
	KDM4A/JMJD2A	Sigma	SAB3500095	5 µg
	H3	Abcam	1791	5 µg
	H3K9me1	Diagenode	pAb-065-050	4 µg
	H3K9me2	Diagenode	pAb-060-050	4 µg
	H3K9me3	Diagenode	MAb-146-050	4 µg
	H3K36me3	Diagenode	CS-058-100	20 µl
	rabbit IgG	Sigma	I5006	5 µg
	sheep IgG	Sigma	I5131	5 µg
	mouse IgG	Sigma	I5381	5 µg

Table S2. List of primers and probes used in ChIP assay

Tetraplex	Region	Name	Position*	Sequence (5'-3')
I	Promoter	Pr_F	42941-42956	GCCCCGGGGGAGGTAT
		Pr_R	42995-17	GAGGACAGCGTGTCTCAGCAATAA
		Pr_p	42958-42982	FAM-TCTTTTCGCTCCGAGTCGGCATTG-BHQ2
	18S	18S_F	4390-4404	CCCGCCCCTTGCCTC
		18S_R	4426-4443	CCGCGGGACACTCAGCTA
		18S_p	4406-4424	RED-CGGCGCCCCCTCGATGCTC-BHQ2
	5.8S	5.8_F	6452-6470	TGTGAAACCTTCCGACCCC
		5.8_R	6509-6524	GGGGTTGCGTCAGGCC
		5.8_p	6475-6503	Cy5-CGGAGTCCGGTCCCGTTTGCTGTCTCGTC-BHQ2
	IGS2	I2_F	35996-36012	CGGGCCTTGGCAGATTC
		I2_R	36107-36126	CGCGCGTAGAGGAGAGATTT
		I2_p	36067-36089	HEX-CCCCGAGTGACTGTGGCTCGCAC-BHQ2
II	5' ETS	5E_F	1783-1799	CCGTGCCGAGTCGTGAC
		5E_F	1844-1859	CGCTTTCCAGGGCCA
		5E_p	1803-1821	Cy5-TGCCGACGACCGCGTTTGC-BHQ2
	28S	28S_F	11740-11763	GAGATTCCCACTGTCCCTACCTAC
		28S_R	11792-11808	CTGATTCCGCCAAGCCC
		28S_p	11765-11788	FAM-ATCCAGCGAAACCACAGCCAAGGG-BHQ2
	IGS1	I1_F	20171-20187	GCGAGGCACAGCGCATC
		I1_R	20252-20271	GGCATCAGCTCCAACTCCAG
		I1_p	20189-20211	RED-CTTTGGAAGCCGCGGCAACGCCT-BHQ2

\*-positions correspond to numeration in human rDNA complete repeating unit, accession number: U13369

BHQ2 - BlackHoleQuencher2

FAM - 6-carboxyfluorescein

HEX - Hexachloro-fluorescein

RED – Texas Red

Table S3. List of siRNA (sequence of the plus strand)

KDM4A-1	GUUCGAGAGUUCCGCAAGAdTdT
KDM4A-2	GUAUGAUCUUCAGACUUAAdTdT
KDM4A-3	GGGAUUCUAUCUCUUCUGAdTdT
KDM4A-5'UTR	CUGACUAAAAGGGACCUCAAdTdT
Non-targeting (siCtle)	CAUGUCAUGUGUCACAUCUdTdT
SGK1-1	CAGCUGAAAUGUACGACAAdTdT
SGK1-2	GGCUACCUGCAUUCACUGAdTdT

Table S4- List of primers used in RT-PCR.

JMJD2A	Forward	CACATCCACCGGACTTCTTT
	Reverse	GTTCTCGGTGTTCAAGCAAT
JMJD2B	Forward	TCAGGGTTGTACCCGAAGAG
	Reverse	GCCACCTTTGCAGAATAAA
JMJD2C	Forward	GCTTGCGAGAAGGTCATTTC
	Reverse	AGACAGTCTCGGCTCACGAT
rRNA	Forward	GCCCGGGAGAGCACGAC
	Reverse	GCGTGTCAGGCGTTCTCG
UBF	Forward	CCCCTTATTTCCGCTTCTTC
	Reverse	TTTCGCTCGAACTCCTGTTT
RPA194	Forward	ACATTTGGATTTCGCCTTCAG
	Reverse	TGTCTGGGCAGATGACTGAG

### **Figure S1. Co-localization between KDM4A and nucleolar proteins**

**A.** Actively growing U2OS cells (60-70% confluent) were fixed following extraction with 1% Triton X100 and analyzed by indirect immunofluorescence using antibodies specific to human KDM4A (panel 1), and nucleolar markers (panel 2, human Pol-I largest subunit A194, Fibrillarin and UBF). Nuclear DNA was stained by DAPI (panel 3). Images were acquired with a Leica microscope (DM6000, 100X Objective). 5 Z-sections at 0.2  $\mu\text{m}$  spacing were projected onto a single plan. One representative nucleus with associated merged images (panel 4) and a 5 X zoom on nucleoli containing area (panel 5) are shown. Bar = 5  $\mu\text{M}$ .

**B.** Actively growing U2OS cells (60-70% confluent) were fixed and analyzed by indirect immunofluorescence using two distinct antibodies specific to human KDM4A (panel 1): Ab1 (Bethyl Lab) and Ab2 (Sigma). Nuclear DNA was stained by DAPI (panel 2). Merged images are shown (panel 3). Bar = 5  $\mu\text{M}$ .

### **Figure S2. KDM4A colocalisation with nucleolar protein in various cell lines**

**A.** WI38, GC92 and HeLa human cells were fixed and analyzed by indirect immunofluorescence using antibodies specific to human KDM4A (panel 1) and Fibrillarin (panel 2); nuclear DNA was stained by DAPI (panel 3). Merged images are shown (panel 4). Bar = 5  $\mu\text{M}$ .

**B.** U2OS cells were fixed and analyzed by indirect immunofluorescence using antibodies specific to human LSD1 (panel 1), and human Pol-I largest subunit A194 (panel 2); nuclear DNA was stained by DAPI (panel 3). Merged images are shown (panel 4). Bar = 5  $\mu\text{M}$ .

### **Figure S3. Raw data of ChIPs**

#### **Figure S4. Efficiency of siRNA mediated KDM4 depletion**

**A.** The levels of the mRNAs KDM4A were analyzed in cells electroporated with either a non targeting siRNA (Scr) or two siRNAs directed against KDM4A (A1 and A2). Signals were normalized to the mRNA levels of the housekeeping gene encoding the ribosomal phosphoprotein P0.

**B.** U2OS cells were electroporated with either a non targeting siRNA (siScr) or a siRNA directed against KDM4A (siKDM4A) and the levels of KDM4A, A194 and UBF were determined 24 hours post-transfection by Western-blotting; TUBULIN ( $\alpha$ -TUB) was used as a loading control.

#### **Figure S5: KDM4A stability is regulated by serum**

**A.** U2OS cells were serum starved for 24 hours ( $t=0$ ) and refed with serum. Cells were collected at 1 hour ( $t=1$ ) and 2 hours ( $t=2$ ) following serum addition. The levels of the 45S pre-rRNA, and the mRNA encoding for UBF, A194, KDM4A-C were analyzed at each time point. Signals were normalized to the mRNA levels of the housekeeping gene P0.

**B.** U2OS cells were serum starved for 24 hours ( $t=0$ ) and refed or not with serum, as indicated. Levels of KDM4A, A194 and UBF in total cell extracts were determined at different time points after re-feeding by Western-blotting;  $\beta$ -Actin ( $\beta$ -Act) was used as a loading control.

**C.** U2OS cells were serum starved for 24 hours and protein synthesis was inhibited by cycloheximide (CHX). Cells were either left starved (lanes 1-4) or treated with serum (lanes 5-8). Levels of KDM4A, A194 and UBF in total cell extracts were determined at different time

points after cycloheximide treatment by Western blotting.  $\beta$ -Actin ( $\beta$ -Act) was used as a loading control.

**Figure S6. Histone H3 occupancy is affected during activation of Pol-I transcription whereas H3K36me3 associated with active rDNA is not a target of KDM4A.**

**A.** Chromatin eluted from the first IP round (as in Fig. 4B) was analyzed as in Fig. 2B. Standard deviations from three independent experiments are shown.

**B.** Chromatin which was used for the sequential ChIP (Fig. 4B) was subjected for the immunoprecipitation using antibody specific to histone H3. Analysis was performed as in Fig.2B. Standard deviations from three independent experiments are shown.

**C.** Chromatin eluted from the first IP round (as in Fig. 4B) was subjected for the second IP round using antibodies specific to histone H3. Analysis was performed as in Fig.1C. All signals were normalized to control IgG. Standard deviations from three independent experiments are shown.

**Figure S7. Efficiency of kinase inhibition**

**A-D.** U2OS cells were treated as in Fig. 4. Whole cell extracts were then analyzed by western blot using antibodies specific to the indicated proteins : phosphorylated AKT (Ser 473), total AKT, phosphorylated ERK1/2, phosphorylated S6K (Thr389), total S6K, phosphorylated NDRG1, total NDRG1 and Tubulin as a loading control, as indicated. The vertical lane in A indicates the localisation of a cut during figure preparation.

**E.** U2OS cells were transfected with the indicated siRNAs and treated as in Fig. 5. Whole cell extracts were then analyzed by western blot using antibodies specific to the indicated proteins :

SGK1, phosphorylated AKT (Ser 473), total AKT, phosphorylated NDRG1, total NDRG1, KDM4A and Tubulin as a loading control, as indicated.

**Figure S8: Effects of the various inhibitors in serum starved cells**

**A-B.** U2OS cells were serum starved for 24 hours and refed with serum (**B**) or not (**A**) in the presence of 5-FUrd and PI3K inhibitor LY294002 (LY), mTOR inhibitor rapamycin (Rapa), MAPK inhibitor PD98059 (PD), PDK1 inhibitor or SGK1 inhibitor, as indicated. Control cells were left untreated (Untr). 30 min after serum addition cells were fixed and analyzed by indirect immunofluorescence using antibodies specific to human KDM4A (panels 1) and 5-FUrd (panels 2); nuclear DNA was stained by DAPI (panels 3). Bar = 5  $\mu$ M.

**C.** Quantification of 5-FUrd staining in A and B experiments, as described in Fig. 2F.

**D.** U2OS cells were transfected by the indicated siRNAs in Figure 5C, and treated or not with serum in the presence of 5-FUrd. 5FUrd staining was quantified in the cell populations as described Fig. 2F.

**Figure S9: Mutant KDM4A functions as a dominant negative mutant.**

**A.** U2OS cells were transfected by the indicated siRNAs and expression vectors for KDM4A wild type or mutant (or empty pcDNA3 vector, first two samples), and treated as in Fig. 6A. Whole cell extracts were then analyzed by western blot using antibodies specific to KDM4A and Tubulin as a loading control. Two different exposures of the KDM4A western blot are shown. The vertical lane indicates the localisation of a cut during figure preparation.



**B.** U2OS cells were electroporated with an expression vector encoding either wild type KDM4A (wt) or catalytically inactive mutant (mut) or with empty vector (Vector). Cells were grown for 24 hours and then starved for another 24 hours before serum refeeding in the presence of 5-FUrd. 30 min after serum addition cells were fixed and analyzed by indirect immunofluorescence using antibodies specific to 5-FUrd (panel 1); nuclear DNA was stained by DAPI (panel 2).

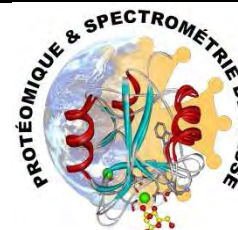
**C.** Quantification of 5-FUrd staining from the experiment shown in A as described in Fig. 2F.

## **Annexe 2 : Test d'étude des phosphorylations de JMJD2A**

## **Annexe 2 : Test d'étude des phosphorylations de JMJD2A**



IPBS/CNRS  
205, route de Narbonne 31077 Toulouse Cedex  
Tel : 33 (0) 561 17 59 00  
Fax : 33 (0) 561 17 59 94



Odile Schiltz  
Beau Mathilde  
[Odile.Schiltz@ipbs.fr](mailto:Odile.Schiltz@ipbs.fr)  
[beau.mathilde@ipbs.fr](mailto:beau.mathilde@ipbs.fr)  
Tel : 33 (0) 561 17 54 13

Marie Vandromme, PhD  
UMR 5088 CNRS/Université Paul Sabatier  
118 Route de Narbonne  
31062 Toulouse Cedex  
France

Réunion	02/10/13
Réception échantillons	05/05/14
Analyse machine	16/05/14
Envoi des résultats	27/05/14

Devis n°192

Date : 05/2014

## Identification des sites de phosphorylation de la protéine KDM4A, immunoprécipitée via son tag GFP, série 2

**Ingenieur en charge de l'étude** : Mathilde Beau Bourderieux

⇒ Fichier : \\gandalf\ Partage beau\ PROJETS PLATEFORME\Vandromme\_KDM4A\Etude Phospho\Série2\rapportMAB\_KDM4A\_phospho\_serie2\_052014

### **Objectifs de l'analyse protéomique :**

Le projet porte sur la protéine KDM4A, qui est une histone déméthylase. Cette protéine est impliquée dans la transcription de l'ARN polII, qui synthétise les ARN ribosomiques. Cependant, son rôle n'est pas encore bien défini.

Le projet se décompose en deux parties, une partie visant à définir l'interactome de KDM4A, l'autre porte sur les PTM de KDM4A. En effet, il a été montré que KDM4A migre dans le nucléole, où se trouve l'ARN polII, et l'équipe suppose qu'une phosphorylation serait impliquée dans ce mécanisme. Nous allons donc tout d'abord nous concentrer sur les phosphorylations présentes sur KDM4A.

Une première analyse en spectrométrie de masse a déjà été menée. Celle-ci avait été effectuée à partir d'un éluat d'IP de la protéine taguée streptag, à partir de cellules cultivées avec ou sans sérum. Ces éluats s'étaient avérés très chargés en protéine. Après migration, la zone devant correspondre à la protéine KDM4A avait été découpée. Les résultats avaient révélés une très faible

quantité de la protéine KDM4A, ne permettant pas d'obtenir de bons résultats quand à l'analyse de phosphorylation.

Pour cette nouvelle analyse, différents paramètres ont été modifiés. Tout d'abord, l'équipe a changé de système surexprimeur. La protéine est désormais taguée GFP, qui permet une bonne immunoprécipitation de la protéine. Cette fois-ci, la comparaison sera faite entre des cellules contrôles, et des cellules traitées par un inhibiteur de la voie des PI3K (LY294002). Le matériel de départ a été triplé par rapport à la première analyse, et le pourcentage de NP40 a été monté à 0,4%.

### Stratégie d'analyse :

IP de la protéine KDM4A taguée GFP à partir d'extraits totaux de cellules U2OS (humaines). IP effectuée à partir de 30millions de cellules. L'élution est faite en tampon laemmli 1X final.

### Nature de l'échantillon

Type d'échantillon : Eluat de l'IP KDM4A replit en Laemmli 1X final. La totalité de l'échantillon est déposée sur gel après réduction/alkylation. (Gel Tris Glycine 4-12%).

- **Electrophorèse**

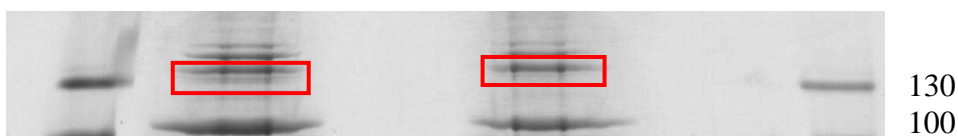
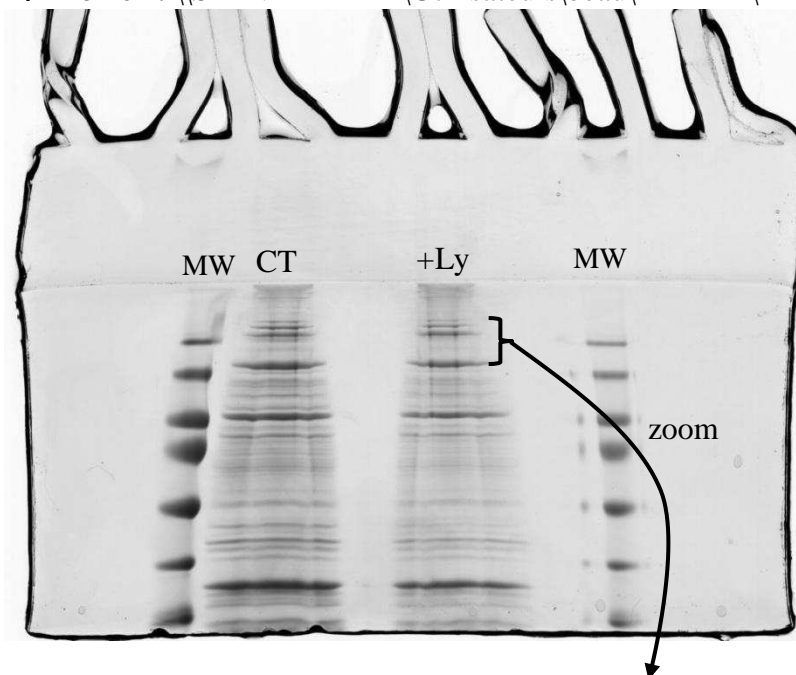
■ 1D

□ 2D

Type de coloration : Instant Blue

Photo du gel :

⇒ **Fichier** : \\SYLVEBARBE\\Utilisateurs\\beau\\KDM4A\\Phospho\\



Nombre de bande à analyser: **2 bandes**

### **Traitement de l'échantillon, Analyse nano-LC-MS/MS et recherche dans les banques de données**

Voir annexe 1 et 2

### **Résultats de l'identification :**

Après migration sur gel d'acrylamide, on peut voir que les éluats de cette IP sont beaucoup moins complexes que lors de l'IP précédente. Après concertation avec Marie Vandromme, une fine bande de gel a été découpée, comprenant deux bandes visibles en bleu (dont une plus intense que l'autre). Comme attendu, suite au gel précédemment effectué par leur soin, la quantité de matériel est moins importante dans la condition traitée au Ly294002 (un facteur 1,3 environ d'après les aires de la protéine KDM4A). La seconde bande est alors très faible dans cette condition traitée.

Lors de la première analyse, différents modes de fragmentation avaient été testés, mais la faible abondance de la protéine n'avait pas permis de conclure sur le mode le plus adapté à l'observation de phosphorylation sur cette protéine. Ici, les échantillons ont été analysés sur une machine de toute dernière génération, selon un model appelé « Data dependant decision tree » (DDDT). Pour rappel, il existe deux modes de fragmentation :

- le mode utilisé pour des analyses classiques, le CID (collision induced dissociation) : Ce mode de fragmentation plutôt dur ne permet pas en théorie de garder les modifications post-traductionnelles (MPT) labiles sur la séquence. Sont alors observés des pertes de charges correspondant à ces MPT.

- le mode ETD (electron transfer dissociation), qui est un mode plus doux : Ce mode permet théoriquement de garder les MPT sur la séquence, dont on peut alors déterminer la position.

Lors de l'analyse DDDT, est appliqué l'un ou l'autre de ces modes de fragmentation, le plus approprié selon le type de donnée (m/z, charge ...).

Trois répliqués d'injections ont été effectués. Les fichiers ont été traités par le logiciel Proteome Discoverer, qui prend en charge les analyses DDDT.

La protéine KDM4A est bien identifiée dans les échantillons. De plus, elle fait partie des protéines majoritaires, et ressort en seconde position des protéines les plus abondantes de l'extrait. Il est donc probable que KDM4A corresponde à la bande plus claire sur le gel.

Elle est identifiée avec un score moyen de 550, et une couverture de séquence totale pour les 6 injections de 40%. En compilant toutes les injections, 45 peptides uniques sont identifiés.

Cependant, parmi tous les peptides identifiés, aucun ne présente de phosphorylation.

## **Conclusions**

L'équipe s'intéresse à la phosphorylation de la protéine de KDM4A. Pour cela, une immunoprécipitation (IP) de cette protéine taguée GFP est effectuée, à partir de 30 millions de cellules. Elle est effectuée dans deux conditions de culture différentes, contrôle ou traitées par des inhibiteurs de la voie des PI3K.

Les éluats de ces IP sont déposés sur gel d'acrylamide dans le but de ne découper que la bande correspondant à KDM4A, repérable en western blot. Après migration de ces éluats, on peut observer qu'ils sont beaucoup moins chargés en protéine que lors de la première analyse. Une bande est découpée dans chaque piste, supposée correspondre à la zone de présence de la protéine KDM4A (vérifiée par western blot).

Les deux échantillons sont analysés en spectrométrie de masse, sur un spectromètre de toute dernière génération, de manière DDDT (« Data dependant decision tree »). Cette méthode permet d'obtenir à la fois des spectres issus de la fragmentation CID et ETD (plus douce). Le mode de fragmentation est adapté selon le type d'ion ( $m/z$ , charge ...). Des triplicats d'injection sont effectués.

La protéine KDM4A est bien identifiée dans les deux échantillons, avec un score moyen de 550 et 45 peptides uniques sur les six analyses. Les résultats sont donc comparables à ceux obtenus lors de la première analyse. L'échantillon global est beaucoup moins complexe mais il ne permet pas d'observer de peptides phosphorylés. Ainsi, la protéine d'intérêt fait parti des protéines majoritaires de l'extrait (seconde par ordre d'abondance) mais elle reste cependant trop faiblement présente afin de pouvoir observer des phosphorylations. En effet, il est très probable que seule une partie de la protéine soit phosphorylée, ainsi les peptides majoritaires de la protéine ne porteront pas cette modification.

Cette analyse a été effectuée sur un appareil totalement différent de la première analyse, il sera ainsi très difficile de comparer les deux expériences en terme d'intensité de signal.

Afin de pouvoir observer des phosphorylations sur la protéine, il serait donc important d'augmenter considérablement la quantité de matériel de départ. Ceci pourrait être fait sur une condition contrôle uniquement. De plus, il est important de noter que les inhibiteurs de phosphatase sont essentiels dans ce type d'expérience, et qu'il est primordial de respecter les doses préconisées ainsi que la durée de vie de ces molécules.

# Annexe 1

## Traitement de l'échantillon

**Le protocole suivi est dans le livret des protocoles p60-70: Traitement des échantillons 1D ou 2D pour l'analyse protéomique (site IPBS).**

**Les étapes de lavages et d'extraction des peptides sont réalisées à la main**

- **Lavages**

- **Réduction/Alkylation**



OUI



NON

- **Digestion Trypsine**

Trypsine Proméga (20µg de trypsine repris dans du bicarbonate d'ammonium 50mM : solution à 0.01µg/µL).

Ajout de **0.5** µg d'enzyme et incubation 15 minutes à TA. Puis ajout de 100µl de tampon 50 mM d'ammonium bicarbonate

Digestion **toute la nuit** à 37°C.

- **Extraction des peptides**

-Le surnageant de digestion a été prélevé et conservé et les morceaux de gels incubés avec du bicarbonate d'ammonium 50 mM à 37 °C pendant 15 min sous agitation. Le surnageant a été prélevé et ajouté au premier surnageant. Les morceaux de gel ont ensuite été incubés avec un mélange eau milliQ-Acétonitrile-acide formique 50/50/5 à 37°C pendant 15 min sous agitation. Cette étape qui permet d'extraire les peptides les plus hydrophobes a été répétée deux fois. L'ensemble des surnageants prélevés ont été réunis et déshydratés dans un évaporateur rotatif.

-Les échantillons à sec ont ensuite été conservés à -20°C.

Avant l'analyse, les échantillons sont repris dans 17 µL de tampon 2% acétonitrile, 0.05% TFA.

17 µl d'échantillons sont analysés sur le Fusion (5µl sont réellement injectés par analyse), colonne de 50cm.



## Annexe 2

### Analyse par Spectrométrie de masse : NanoLC/ESI Fusion MS/MS

- Acquisition method :

- Descriptif des échantillons: Voir Annexe 4

### Interrogation des banques de données protéiques par Proteome Discoverer

MAB KDM4A\_DDDT\_Phospho\_1.4\_Area detector

- Paramètres de recherche CID

Banque de donnée	<b>Sprot</b>
Espèce	<b>Human</b>
Type de banque	Protéine
Masses précurseur/fragment	Monoisotopiques
Enzyme	Trypsine/P
Maximum de coupures manquées	<b>3</b>
Peptide Mass Tolerance	± 5 ppm
Fragment Ion Tolerance	± 0.8 Da
Instrument type	ESI-TRAP
Modifications différentielles : Fixe	Carbamidomethyl (C) : +57.0520 Da
Variables	Oxydation (M) : +15.9949 Da Acetyl (N-term): + 42.010565 Da Phospho (ST) Phospho (Y)

- Paramètres de recherche ETD

Banque de donnée	<b>Sprot</b>
Espèce	<b>Human</b>
Type de banque	Protéine
Masses précurseur/fragment	Monoisotopiques
Enzyme	Trypsine/P
Maximum de coupures manquées	<b>3</b>
Peptide Mass Tolerance	± 5 ppm
Fragment Ion Tolerance	± 0.8 Da
Instrument type	ESI-TRAP
Modifications différentielles : Fixe	Carbamidomethyl (C) : +57.0520 Da
Variables	Oxydation (M) : +15.9949 Da Acetyl (N-term): + 42.010565 Da Phospho (ST) Phospho (Y)

## Annexe 3

### Création de la 'Peaklist' (lcq\_dta.exe)

Scan limits	Tous
Minimum Mass-Maximum Mass	<b>300-4500 Da</b>
Grouping Tolerance	<b>0 Da</b>
Intermediate Scans	<b>0</b>
Minimum scans/group	<b>1</b>
Precursor charge	AUTO
Calculate charge	Oui
Minimum peaks	<b>10</b>
Extract MSn	2
Threshold	<b>0</b>

## **Annexe 4**

### **Descriptif des échantillons:**

<b>Fichiers LTQ-Orbitrap (.Raw)</b>	<b>Descriptif des échantillons</b>
OFMAB140516_01	KDM4A_P_+Ly_R1
OFMAB140516_02	KDM4A_P_+Ly_R2
OFMAB140516_03	KDM4A_P_+Ly_R3
OFMAB140516_09	KDM4A_P_CT_R1
OFMAB140516_10	KDM4A_P_CT_R2
OFMAB140516_11	KDM4A_P_CT_R3

## Résumé de la thèse :

L'ADN des cellules eucaryotes est enroulé autour de protéines appelées histones pour former la chromatine. Le niveau de compaction de la chromatine est dynamique. Ceci permet de réguler *via* l'accessibilité de l'ADN, les processus comme la transcription. Les histones peuvent subir des modifications post traductionnelles comme la méthylation, qui influencent le niveau de compaction de la chromatine. Par exemple, au niveau des promoteurs des gènes, la méthylation sur la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9) est associée à la répression transcriptionnelle, tandis que la méthylation sur la lysine 4 (H3K4) est associée à l'activation transcriptionnelle. Ces marques sont mises en place par des histones méthyltransférases et enlevées par des histones déméthylases qui sont spécifiques des résidus méthylés. Ma thèse a porté sur l'étude d'histones déméthylases dans la régulation transcriptionnelle de gènes clé de la prolifération cellulaire, les gènes cibles de E2F et l'ADN ribosomique.

Les facteurs E2Fs régulent des gènes comme *CCNE* et *CDC6* impliqués dans l'entrée et la progression en phase S. Ces gènes sont activés au début de la phase S. Le contrôle de la transcription de ces gènes est crucial pour un cycle cellulaire normal et leur dérégulation est associée à l'apparition de cancers. La répression et l'activation des gènes cibles de E2F au cours du cycle cellulaire fait intervenir le contrôle de la méthylation des résidus H3K4 et H3K9. Cependant, les histones déméthylases impliquées sont mal connues. Nous avons montré que les histones déméthylases JARID1A et JARID1B, spécifiques de H3K4, régulent la transcription de *CCNE* et *CDC6* en phase S. JARID1A et JARID1B sont recrutées au promoteur de ces gènes. Elles sont importantes pour limiter leur activation lors de la progression en phase S. Cette étude montre pour la première fois l'implication de ces histones déméthylases dans la régulation fine des gènes cibles de E2F au cours du cycle cellulaire.

La transcription des gènes ribosomiques ou ADNr par l'ARN Polymérase I (Pol-I) est la première étape de la biogénèse des ribosomes. Elle a lieu dans les nucléoles. Ce processus est étroitement lié à la croissance et la prolifération cellulaire. Une transcription Pol-I accrue et des nucléoles hypertrophiés sont des caractéristiques communes à un grand nombre de cellules cancéreuses. La transcription Pol-I est adaptée à la disponibilité en facteurs de croissance. Ainsi, elle est réprimée lorsque les cellules sont privées en facteurs de croissance et activée en leur présence. Cette réponse est sous le contrôle de cascades de signalisation cellulaire comme la voie Phosphatidyl-Inositol-3-Phosphate (PI3K). Il est connu que des événements dynamiques de méthylation d'histones participent à cette régulation. Cependant, on sait peu de choses sur comment les voies de signalisation régulent ces événements. En collaboration avec l'équipe du Dr. Konstantin Panov, nous avons observé que l'histone déméthylase JMJD2A, spécifique de H3K9, est présente dans les nucléoles de cellules humaines. JMJD2A, via sa capacité à déméthyliser H3K9, est requise pour activer la transcription Pol-I en réponse aux facteurs de croissance. Nous montrons également que PI3K régule cette réponse chromatinienne en déclenchant l'accumulation de JMJD2A dans les nucléoles en réponse aux facteurs de croissance. Cette étude indique que la régulation de la localisation subnucléaire de JMJD2A en réponse à la voie PI3K est un des mécanismes par lesquels les cellules adaptent leur capacité de synthèse protéique à la disponibilité de facteurs de croissance.

Mes travaux de thèse renforcent notre compréhension des mécanismes impliquant des histones déméthylases dans la régulation de la prolifération cellulaire. Comprendre ces mécanismes est crucial et permettra de cibler ces enzymes dans le traitement des pathologies de la prolifération cellulaire comme le cancer.